

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la seguridad y eficacia de la infusión
intracoronaria de células madre residentes cardiacas en
pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción
ventricular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Casado Plasencia

Directores

**Francisco Fernández-Avilés Díaz
Ricardo Sanz Ruiz**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Evaluación de la seguridad y eficacia de la infusión intracoronaria de células madre residentes cardiacas en pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción ventricular

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Ana Casado Plasencia

DIRECTORES

Francisco Fernández-Avilés Díaz

Ricardo Sanz Ruiz

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Evaluación de la seguridad y eficacia de la infusión intracoronaria de células madre residentes cardiacas en pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción ventricular

Ana Casado Plasencia

Madrid, 2019

Directores:

Francisco Fernández-Avilés Díaz

Ricardo Sanz Ruiz



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. ANA CASADO PLASENCIA,
estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Evaluación de la seguridad y eficacia de la infusión intracoronaria de células madre residentes cardiacas
en pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción ventricular.

y dirigida por: Francisco Jesús Fernández-Avilés Díaz y Ricardo Sanz Ruiz.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 15 de julio de 2019

CASADO
PLASENCIA
ANA -
Fdo.: 48565165K

Firmado digitalmente
por CASADO
PLASENCIA ANA -
48565165K
Fecha: 2019.07.10
12:46:50 +02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A Sergio,

A mi marido,

A toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias al Profesor Francisco Fernández-Avilés, líder de este proyecto, por su incesante promoción de la terapia celular aplicada a las enfermedades cardiovasculares, por la confianza que ha depositado en mí como cardióloga y científica, y por dirigir y supervisar este trabajo.

A Ricardo Sanz, por enseñarme la metodología de la investigación, por compartir conmigo su visión rigurosa y humana de la práctica clínica, y por ayudarme a concluir este trabajo de investigación con éxito.

A Luis Álvarez-Sala por su ayuda y perseverancia.

A todos y cada uno de los profesionales del Servicio de Cardiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, en especial a los que forman la sección de hemodinámica, por su amistad y valiosas enseñanzas. A Sandra Vázquez, por estar ahí en los momentos buenos y en los malos.

A mis padres, ejemplos a seguir en todos los aspectos de la vida, y a mis hermanas, por el cariño y ayuda que me ofrecen a diario.

Finalmente, quiero dar las gracias en especial a mi marido José Luis, por su amor, apoyo y comprensión incondicionales, y por darme el regalo más maravilloso de mi vida, nuestro hijo Sergio.

ACRÓNIMOS

BMMNC: Células madre MonoNucleares derivadas de la Médula Ósea

MSC: Células madre Mesenquimales

ADSC: Células madre Derivadas de tejido Adiposo

ESC: Células madre Embrionarias

CSC: Células madre residentes cardiacas

CS: Cardioesferas

CDC: Células Derivadas de Cardioesferas

AlloCSC-01: Células madre residentes cardiacas alogénicas

IAM: Infarto Agudo de Miocardio

IAMCEST: Infarto Agudo de Miocardio con Elevación del Segmento ST

IC: Insuficiencia Cardíaca

FEVI: Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo

VI: Ventrículo Izquierdo

ICP: Intervencionismo Coronario Percutáneo

RM: Resonancia Magnética

Nt-proBNP: Fracción N-terminal del PRO péptido Natriurético Cerebral

BNP: Péptido Natriurético Cerebral

PCR: Proteína C Reactiva

NYHA: New York Heart Association

MLHFQ: Cuestionario de calidad de vida con insuficiencia cardíaca de Minnesota

MACE: Evento Adverso Mayor de origen Cardiovascular

EA: Evento Adverso

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

IFN: Interferón

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

IL: Interleucina

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

VEGF: Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular

SDF: Factor Derivado de células del eStroma

IGF: Factor de Crecimiento Insulínico

CXCR: Receptor de la Quimiocina

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS.....	11
MÉTODOS Y RESULTADOS.....	12
CONCLUSIONES	13
II. SUMMARY	14
INTRODUCTION.....	14
OBJECTIVE	14
METHODS AND RESULTS	15
CONCLUSIONS	15
III. INTRODUCCIÓN.....	16
IV. ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA CELULAR APLICADA A LAS ENFERMEDADES	
CARDIOVASCULARES	18
A) <i>Requisitos para la terapia cardiovascular con células madre</i>	<i>18</i>
B) <i>Fuentes de células madre para la regeneración cardíaca</i>	<i>19</i>
1. Células madre precursoras de músculo esquelético	19
2. Células madre derivadas de médula ósea	21
a) Células madre mononucleares derivadas de la médula ósea	21
b) Células madre mesenquimales	24
3. Células madre residentes cardíacas	28

4.	Células madre alogénicas para la reparación cardiaca	35
5.	Otros tipos celulares	41
6.	Regeneración cardiaca acelular	42
C)	<i>Liberación de las células madre en el corazón</i>	<i>43</i>
1.	Técnicas de liberación	43
a)	Infusión intracoronaria	45
b)	Inyección intramiocárdica	45
c)	Administración intravenosa	48
2.	Momento de liberación	49
D)	<i>Aplicación de los conocimientos actuales a nuestro estudio</i>	<i>50</i>
V.	HIPÓTESIS	54
VI.	OBJETIVOS	55
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	56
A)	<i>Diseño del estudio</i>	<i>56</i>
1.	Primera fase abierta de escalado de dosis	58
2.	Segunda fase aleatorizada doble ciego	58
B)	<i>Población de estudio</i>	<i>59</i>
1.	Pacientes elegibles	59
2.	Cálculo del tamaño muestral	60
C)	<i>Tratamientos aplicados</i>	<i>61</i>
1.	Asignación del tratamiento	61
2.	Protocolo de aplicación del tratamiento	64
D)	<i>Variables de medida</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.	End-point principal	65

2.	End-points secundarios	66
a)	Seguridad durante el seguimiento	66
b)	Eficacia.....	67
c)	Vigilancia inmunológica	68
E)	<i>Seguimiento</i>	69
F)	<i>Análisis estadístico</i>	69
VIII.	RESULTADOS	72
A)	<i>Bioequivalencia entre los lotes celulares</i>	72
B)	<i>Población de pacientes incluidos en el estudio</i>	75
C)	<i>Resultados obtenidos en el objetivo primario de seguridad</i>	78
D)	<i>Resultados obtenidos en los objetivos secundarios de seguridad</i>	79
E)	<i>Resultados obtenidos en los objetivos secundarios de eficacia</i>	82
IX.	DISCUSIÓN	87
X.	LIMITACIONES Y FORTALEZAS	92
XI.	NUESTRAS PRINCIPALES APORTACIONES Y VÍAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS	93
XII.	CONCLUSIONES	96
XIII.	BIBLIOGRAFÍA	98

I. RESUMEN

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Sin embargo, los tratamientos actuales sólo hacen más lenta la evolución natural de la insuficiencia cardíaca. En este contexto, las terapias regenerativas han adquirido gran interés. La mayoría de las enfermedades cardiovasculares, incluida la cardiopatía isquémica, se asocian a una pérdida de cardiomiocitos funcionales; desafortunadamente, el corazón tiene una capacidad de regeneración limitada y no puede reemplazar todos estos cardiomiocitos una vez perdidos. En los últimos años, las células madre se han presentado como una fuente potencial para la reparación cardíaca. Concretamente, las células madre cardíacas alogénicas (AlloCSC-01) han demostrado tener propiedades protectoras, inmunorreguladoras y regenerativas con un perfil de seguridad robusto en ensayos preclínicos.

Objetivos

Nuestro objetivo principal es investigar la seguridad y la viabilidad de la administración intracoronaria temprana de AlloCSC-01 en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST).

Específicamente, el objetivo primario es la seguridad e incluye muerte por todas las causas y eventos cardíacos adversos mayores a los 30 días (MACE: muerte por todas las

causas, reinfarto, hospitalización por insuficiencia cardíaca, taquicardia ventricular sostenida, fibrilación ventricular y accidente cerebrovascular). Los objetivos secundarios de seguridad incluyen MACE a los 6 y 12 meses, eventos adversos (EA) y vigilancia inmunológica. Los objetivos secundarios de eficacia exploratoria son los cambios en el tamaño del infarto (% de masa del ventrículo izquierdo) y los índices de remodelado ventricular por resonancia magnética (RM) a los 12 meses.

Métodos y Resultados

CAREMI fue un ensayo de fase I/II, multicéntrico, aleatorizado y controlado con placebo en pacientes con IAMCEST, fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) \leq 45% y tamaño de infarto \geq 25% de la masa del ventrículo izquierdo (VI) por RM, que fueron aleatorizados (2:1) para recibir AlloCSC-01 o placebo por vía intracoronaria 5 a 7 días después de un IAMCEST. Se incluyeron 49 pacientes (92% hombres, 55 ± 11 años), 33 asignados al azar a AlloCSC-01 y 16 a placebo. No se reportaron muertes o MACE a los 12 meses. Un EA grave en cada grupo se consideró posiblemente relacionado con el tratamiento del estudio (dermatitis alérgica y erupción). AlloCSC-01 provocó bajos niveles de anticuerpos específicos del donante en 2 pacientes. No se encontraron EA relacionados con el sistema inmunitario y no se observaron diferencias entre los grupos en los parámetros de eficacia basados en RM a los 12 meses. El efecto estimado del tratamiento con AlloCSC-01 en el cambio absoluto del tamaño del infarto fue de -2,3% (IC del 95%: -6,5 a 1,9%).

Conclusiones

Las células madre cardíacas alogénicas pueden administrarse de manera segura en pacientes con IAMCEST y disfunción secundaria del VI tempranamente después de la revascularización. La baja inmunogenicidad y la ausencia de eventos inmunomediados facilitarán los estudios posteriores con poder adecuado para demostrar su eficacia clínica en este contexto.

II. SUMMARY

Introduction

Cardiovascular disease is a major cause of morbidity and mortality throughout the world. However, current treatments only slow heart failure progression. Regenerative therapies are of major interest in these cases. Most cardiovascular diseases, including ischemic heart disease, are associated with loss of functional cardiomyocytes. Unfortunately, the heart has a limited regenerative capacity and is not able to replace these cardiomyocytes once lost. In recent years, stem cells have been put forward as a potential source for cardiac repair. Successfully tested in pre-clinical trials, allogeneic cardiac stem cells (AlloCSC-01) have shown protective, immunoregulatory and regenerative properties with a robust safety profile.

Objective

Our main aim is to investigate the safety and feasibility of early intracoronary administration of AlloCSC-01 in patients with ST segment elevation myocardial infarction (STEMI).

Specifically, the primary endpoint is safety and includes all-cause death and major adverse cardiac events at 30 days (MACE: all-cause death, reinfarction, hospitalization due to heart failure, sustained ventricular tachycardia, ventricular fibrillation and stroke). Secondary safety endpoints include MACE at 6 and 12 months, adverse events (AE) and immunological surveillance. Secondary exploratory efficacy endpoints are changes in

infarct size (% of the left ventricular mass) and indices of ventricular remodeling by magnetic resonance (MR) at 12 months.

Methods and Results

CAREMI was a phase I/II multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with STEMI, LVEF \leq 45% and infarct size \geq 25% of left ventricular (LV) mass by cardiac MR, who were randomized (2:1) to receive AlloCSC-01 or placebo through the intracoronary route at day 5-7 after a STEMI. Forty-nine patients were included (92% male, 55 \pm 11 years), 33 randomized to AlloCSC-01 and 16 to placebo. No deaths or MACE were reported at 12 months. One severe AE in each group was considered possibly related to study treatment (allergic dermatitis and rash). AlloCSC-01 elicited low levels of donor specific antibodies in 2 patients. No immune-related AE were found and no differences between groups were observed in MR-based efficacy parameters at 12 months. The estimated treatment effect of AlloCSC-01 on the absolute change from baseline in infarct size was - 2.3% (95%CI -6.5 to 1.9%).

Conclusions

Allogeneic cardiac stem cells can be safely administered in STEMI patients with LV dysfunction early after revascularization. Low immunogenicity and absence of immune-mediated events will facilitate adequately powered studies to demonstrate their clinical efficacy in this setting.

III. INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. En concreto, la enfermedad coronaria se estima que afecta a cerca de 16 millones de personas en los Estados Unidos y representa alrededor de 1 de cada 6 muertes (1). Las terapias farmacológicas e intervencionistas han reducido drásticamente la mortalidad del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) (2), pero han contribuido paradójicamente a una mayor incidencia de insuficiencia cardíaca (IC) crónica postinfarto, que afecta a entre el 6% y el 25% de los supervivientes a los 5 años (3).

La insuficiencia cardíaca es la vía final común de la mayoría de las cardiopatías. El desarrollo de síntomas y el empeoramiento de éstos a lo largo de la vida conllevan un deterioro de la clase funcional, una disminución de la calidad de vida, hospitalizaciones por episodios de descompensación y finalmente una muerte prematura, generalmente por fallo de bomba o arritmia ventricular. La modificación de los factores de riesgo, los nuevos tratamientos médicos enfocados en contrarrestar la activación de la cascada neurohormonal, mejorando la función contráctil y reduciendo la incidencia de muerte súbita, así como las terapias basadas en dispositivos desarrolladas en los últimos años han disminuido las tasas de hospitalización y ligeramente la mortalidad (4, 5). Pese a ello, sigue siendo una entidad con un pésimo pronóstico, a veces incluso peor que muchos cánceres (6). El trasplante cardíaco es una técnica eficaz para el tratamiento de los pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada; sin embargo, la gran mayoría de ellos están

restringidos, principalmente por la escasez de donantes, pero también por la edad del paciente y/o sus comorbilidades.

Desde principios de la década pasada, la terapia regenerativa basada en células madre, con potencial de auto-renovación y diferenciación, ha cobrado aquí especial interés. Hasta el final del siglo XX, se creía que el corazón humano era un órgano postmitótico diferenciado, incapaz de ser reparado después de una lesión. Este dogma fue impugnado en 2001 por la evidencia de mitosis en cardiomiocitos después de un infarto de miocardio (7). Más allá de eso, y en contraste con algunos vertebrados inferiores (8), la capacidad de reparación cardíaca es limitada en humanos adultos (9), e incapaz de reemplazar la pérdida celular masiva que se produce después de un evento isquémico agudo o consecuencia de un remodelado prolongado. Numerosos estudios preclínicos han sido alentadores y han fomentado una rápida traslación clínica, surgiendo numerosos ensayos que pretendían estudiar la aplicación de este tratamiento para la insuficiencia cardíaca aguda y crónica (10). Los informes iniciales en seres humanos establecieron la seguridad de estas terapias; pero su eficacia ha sido objeto de continuo debate debido a la inconsistencia en los beneficios observados. Diferencias en la metodología se han invocado para explicar estas discrepancias. No obstante, la preclínica inicial y estos datos clínicos han proporcionado información importante acerca de la selección y fabricación de productos celulares, su liberación y los mecanismos de acción que impulsan la regeneración miocárdica.

IV. ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA CELULAR APLICADA A LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

A) Requisitos para la terapia cardiovascular con células madre

El músculo cardíaco es un tejido contráctil organizado y dinámico que consta de diferentes constituyentes: miocitos, células musculares lisas vasculares, fibroblastos y una matriz extracelular (11). Las células progenitoras cardíacas no diferenciadas tienen la ventaja de que pueden migrar a áreas lesionadas y formar todos los componentes cardíacos. La actividad paracrina de otros productos celulares extracardíacos en el corazón puede regular este proceso; sin embargo, dado que la reparación cardíaca no se produce espontáneamente en el corazón dañado, ésta puede no ser suficiente.

Por ello, la terapia con células madre ideal debe cumplir con varios requisitos:

- ✓ la capacidad de integración en el miocardio dañado y su reparación, incluyendo vascularización y acoplamiento electrofisiológico;
- ✓ la facilidad de obtención, almacenamiento y administración en el momento y forma adecuados;
- ✓ la ausencia de tumorigénesis, rechazo inmunológico o problemas éticos (el requisito mínimo para las células donantes es no tener efectos adversos sobre el receptor);
- ✓ y la reproducibilidad y rentabilidad de la terapia.

B) Fuentes de células madre para la reparación cardíaca

La fuente óptima de células para reparar el miocardio dañado es un tema de intensa investigación. La heterogeneidad de los productos celulares empleados en los primeros años de la medicina regenerativa cardíaca ha sido sustituida por poblaciones de células madre más purificadas, con una mayor potencial de reparación in vitro, para mejorar su implante, supervivencia, plasticidad y actividad paracrina.

1. Células madre precursoras de músculo esquelético

Los experimentos iniciales utilizaron células precursoras de músculo esquelético autólogas. Su fenotipo muscular y otras características ventajosas, que incluyen facilidad de aislamiento mediante biopsia muscular, rápida expansión in vitro y la ausencia de problemas éticos o inmunológicos, las convirtieron en una opción atractiva (12). De hecho, su uso en modelos animales (13-15) y ensayos en humanos fase I no randomizados (16-20) describió su capacidad para formar algunas estructuras cardíacas y lanzó resultados prometedores en cuanto a una posible mejora en la función contráctil después de un infarto de miocardio. Sin embargo, el primer y mayor ensayo controlado aleatorizado en humanos, el ensayo MAGIC, no mostró beneficios en este parámetro (21).

Más preocupante aún es la falta de acoplamiento electromecánico de estas células, que las hace propensas a generar arritmias ventriculares. En efecto, los mioblastos se diferenciaban en miocitos esqueléticos no específicos en lugar de cardiomiocitos (22), debido a su incapacidad para expresar ciertos genes específicos del corazón que codifican

proteínas de las uniones gap, como N-cadherina y conexina-43 (18, 21, 23). Sin embargo, una mejora del acoplamiento eléctrico, y con ello una reducción en el potencial arritmogénico, es posible gracias al aumento de la expresión de conexina-43 a través de la manipulación genética (24-26).

Otro inconveniente de la aplicación de los mioblastos esqueléticos en la reparación cardíaca es su baja tasa de supervivencia cuando son implantados sobre un miocardio isquémico (27). Factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), han demostrado su capacidad de inducir la angiogénesis (28, 29). De hecho, mioblastos esqueléticos transfectados con expresión aumentada de VEGF y FGF exhiben una mayor supervivencia, promovida por un efecto antiinflamatorio y angiogénico (30, 31). La supervivencia celular después del trasplante también puede mejorarse utilizando mioblastos que carecen del gen MyoD; éstos inducen la angiogénesis a través de la secreción del factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) y del factor de crecimiento placentario (32), y son menos sensibles a la apoptosis por la sobreexpresión de una serie de genes antiapoptóticos (Pax3, Bcl-2, Bcl-xl) (33).

A pesar de estos avances, los mioblastos esqueléticos están lejos de ser la fuente óptima para la medicina regenerativa cardíaca, habiendo sido desplazados por nuevos tipos celulares más seguros y eficaces.

2. Células madre derivadas de médula ósea

Representan una mezcla heterogénea de células madre mononucleares, incluyendo progenitores hematopoyéticos y endoteliales, y células madre mesenquimales.

a) Células madre mononucleares derivadas de la médula ósea

Las células madre mononucleares derivadas de la médula ósea (BMMNC) son el tipo celular de uso más extendido para la regeneración cardíaca. El punto de partida para la utilización de esta estirpe celular fue el estudio de Orlic et al (34) que demostró, en un modelo de ratones, que una población de BMMNC con Lin-/c-kit⁺ era capaz de diferenciarse en miocitos y estructuras vasculares, y restaurar así gran parte del daño producido en el miocardio tras un infarto. Este descubrimiento generó gran interés por estas células, lo que estimuló una investigación intensa y una rápida traslación clínica. Los mecanismos exactos por los cuales las BMMNC cumplen su cometido no son bien conocidos; las explicaciones posibles incluyen efectos paracrinos, la transdiferenciación en cardiomiocitos y la activación de células madre residentes cardíacas (35-37).

Muchos estudios han demostrado un efecto positivo de las BMMNC en la función cardíaca después del infarto de miocardio, tanto en la fase aguda como en fases crónicas (38-44); pero algunos ensayos informaron, por otro lado, de un beneficio menos evidente o incluso ausente (45-55). El origen de esta disparidad puede ser explicado, al menos en parte, por los diferentes contextos clínicos en los que se han probado las células, así como las diferencias metodológicas entre los ensayos. Cinco revisiones sistemáticas y metaanálisis concluyeron que el trasplante de BMMNC después de un infarto de miocardio

resultaba en una mejoría de la función y el remodelado ventricular izquierdo, con una mejora modesta pero significativa de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), variando del 2,55% al 3,96%, sin ningún evento de seguridad detectado. Y, lo que es más llamativo, se observó un mejor pronóstico clínico en los pacientes tratados, aunque estos ensayos no incluyesen criterios clínicos como objetivos primarios (56-60). Los criterios de valoración utilizados en estudios que han demostrado efectos biológicos positivos necesitan traducirse en datos de mortalidad y morbilidad para proporcionar pruebas concluyentes de los beneficios de la terapia celular.

Las terapias basadas en BMMNC tienen que hacer frente a muchas limitaciones: injerto y mantenimiento de células en el tejido trasplantado (61), plasticidad limitada de las células madre adultas (62, 63), y agotamiento y deterioro de su funcionalidad asociados a edad avanzada y comorbilidades (64, 65). Diferentes estrategias se han estudiado en los últimos años para resolver estos problemas. Los microRNA (miRs) son pequeñas cadenas de ácido ribonucleico (RNA) no codificantes que controlan la expresión génica, ya sea induciendo la degradación del RNA mensajero (RNAm) o bloqueando la traducción de éste (66); y están implicados en el mantenimiento del estado pluripotente de las células madre, de forma que su sobreexpresión es capaz de inducir tal estado en células somáticas (66, 67). Por ello, se ha investigado el uso de estos microRNAs para potenciar la terapia con células precursoras. Por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento promueven la regulación al alza de los miR-34 pro-apoptóticos y antiproliferativos en BMMNC humanas. Su inhibición in vitro ha demostrado aumentar la supervivencia celular y beneficio terapéutico en un modelo de infarto de miocardio en ratones (68). Además, in

vivo, las BMMNC parecen regular la expresión de los miRs de cardiomiocitos circundantes. En un modelo de ratones, la administración intramiocárdica de BMMNC media un efecto paracrino liberando factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) que, a su vez, inhibe la expresión del miR-34 pro-apoptótico, ejerciendo así un efecto cardioprotector (69).

Pero, como en el caso de los mioblastos esqueléticos, nuevos y más refinados productos celulares están suplantando a las BMMNC. Mientras tanto, las conclusiones definitivas sobre la eficacia de las BMMNC después del infarto de miocardio se esperan en los resultados del ensayo BAMI (NCT01569178). Este gran ensayo fase III, multinacional, multicéntrico, aleatorizado 1:1, abierto y controlado con grupos paralelos, probará por primera vez, el efecto de la infusión intracoronaria de BMMNC 2 a 8 días después de un infarto agudo de miocardio (IAM) con FEVI $\leq 45\%$ en la mortalidad por todas las causas (70). 375 pacientes fueron incluidos (de los 3000 que inicialmente se aspiraba a reclutar) en 11 centros europeos entre el 1 de noviembre de 2011 y el 31 de octubre de 2017. Actualmente el estudio se encuentra en fase de seguimiento, esperándose los resultados de los últimos pacientes incluidos para el otoño de 2019. Las conclusiones de este ensayo ayudarán a trazar las direcciones futuras que deberían seguir las terapias con BMMNC, apoyando su administración, justificando nuevas investigaciones o dejando de lado definitivamente su uso para centrarse en nuevas generaciones de células madre.

b) Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSC), también conocidas como células estromales multipotentes, representan un subconjunto de células madre derivadas de médula ósea descubierto hace casi 50 años (71), con ventajas atractivas para la reparación cardíaca:

- ✓ Se encuentran en el tejido conectivo de diferentes órganos de los cuales se pueden aislar y cultivar fácilmente (72).
- ✓ Las MSC son multipotentes y tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes de tejidos mesodérmicos (73, 74), incluidos los cardiomiocitos, tanto in vitro (75) como in vivo (76).
- ✓ También, muestran un gran potencial paracrino, segregando factores de crecimiento que promueven la reparación endógena.

Una serie de estudios preclínicos han demostrado el beneficio de estas células en la función cardíaca después de un infarto de miocardio (77-79). Ensayos clínicos también han obtenido resultados prometedores (80, 81), y un pequeño estudio randomizado fase I y II controlado con placebo sugirió que la inyección transendocárdica de MSC era superior a BMMNC y a placebo en cuanto a la reducción del tamaño de la cicatriz en la miocardiopatía isquémica crónica (82).

Pero de manera similar a las BMMNC, el uso autólogo de MSC se ve obstaculizado por la pérdida de su funcionalidad asociada al envejecimiento y comorbilidades del paciente (64, 65), y su fenotipo heterogéneo compromete su efecto terapéutico (83). Se han desarrollado una variedad de estrategias diferentes para mejorar el potencial regenerativo

de las MSC. Uno de las más prometedoras es la llamada “cardiopoyesis guiada” de MSC. Este término define el proceso por el cual se induce la diferenciación de una célula madre hacia una estirpe cardíaca, sin perder sus capacidades de proliferación y auto-renovación (84). Esto se puede lograr imitando los factores de señalización cardiogénicos que impulsan el desarrollo embrionario del corazón (85). La regulación al alza de ciertos factores de transcripción cardíacos tales como Nkx-2.5, MEF2C, FOG-2, TBX5, MESP1 y GATA-4 es responsable de la adopción de un fenotipo cardiogénico en las MSC, conservando su capacidad de proliferación hasta que comience la diferenciación final hacia la sarcomerogénesis (85, 86). Esto es posible cuando las MSC se cultivan en un medio que contiene: factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), proteína morfogénica ósea (BMP)-4, actinina A, FGF-2, IGF-1, interleucina (IL)-6, factor IIa (h- α -trombina) y ácido retinoico (86). En un modelo murino de cardiopatía isquémica, el cultivo de las MSC con estos factores de crecimiento permitió obtener un fenotipo cardiopoyético (con respuesta electromecánica y estructuras mitocondriales más cercanas a las observadas en cardiomiocitos adultos) que mejoró su beneficio terapéutico (86). En un modelo de infarto de miocardio en rata, el trasplante de MSC pretratadas con IGF-1, BMP-2 y FGF-2 produjo una mejor tolerancia a la hipoxia y una expresión aumentada de conexina-43 y uniones gap entre las MSC y los cardiomiocitos. De hecho, las MSC ejercieron un efecto protector contra la hipoxia sobre los cardiomiocitos mediado por estas uniones gap, mostrando así una mayor supervivencia miocárdica del corazón infartado y permitiendo una mejoría de la función ventricular izquierda (87).

El ensayo clínico C-CURE abordó la viabilidad y la seguridad de las células cardiopoyéticas mesenquimales derivadas de la médula ósea de origen autólogo (88). En este estudio fase II, multicéntrico y aleatorizado 2:1 (implante transendocárdico de MSC vs terapia médica óptima), en el que se incluyeron 48 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica de origen isquémico, la terapia con MSC cardiopoyéticas resultó en una mejora total de la FEVI del 7% (en comparación con el 0,2% en el grupo de tratamiento médico), una reducción de los volúmenes del ventrículo izquierdo y un aumento de la distancia recorrida en el test de la marcha de los 6 minutos, sin documentarse eventos adversos relacionados con las células madre (88). Estos resultados motivaron el inicio de dos grandes ensayos clínicos fase III, multicéntricos, y doble ciego controlados con placebo: el CHART-1 cuyos resultados han sido recientemente publicados (89) y el CHART-2 (NCT 02317458) aún en fase de reclutamiento. En el CHART-1, 315 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica y sintomática de origen isquémico fueron aleatorizados 1:1 a tratamiento intramiocárdico con MSC cardiopoyéticas o a placebo (consistente éste en la colocación de un introductor femoral y la realización de una angiografía) (90). El objetivo primario, compuesto por mortalidad por todas las causas, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, puntuación obtenida en el cuestionario de calidad de vida con insuficiencia cardíaca de Minnesota, distancia recorrida en el test de la marcha de los 6 minutos, volumen telesistólico del ventrículo izquierdo y FEVI a los 9 meses, no resultó diferente entre los grupos (89); sin embargo, análisis exploratorios mostraban un cierto beneficio de la terapia celular para el objetivo primario en pacientes que basalmente tenían un ventrículo más dilatado (200–370 mL, representando el 60% de los pacientes incluidos) o

se encontraban en una situación clínica más avanzada (mayor puntuación en el cuestionario de calidad de vida o menor distancia recorrida en el test de la marcha) (89). También es de destacar que la incidencia de muerte súbita, abortada o no, fue significativamente mayor en el grupo control que en el grupo tratado con MSC (0,9% vs 5,4%) (89). 14 pacientes (11,7%) del grupo de tratamiento activo sufrieron eventos adversos graves relacionados con el procedimiento de implante; si bien, no se registraron muertes por estos motivos ni más eventos durante el seguimiento (89).

Un inconveniente de la terapia con MSC es la escasa supervivencia y la baja tasa de retención de las células trasplantadas, lo que limita su potencial reparador. Una modificación genética exvivo puede mejorar su viabilidad por sobreexpresión de genes antiapoptóticos: MSC transducidas con vectores que codifican genes tales como la proteína de choque térmico (Hsp27) (91), microRNA-1 (92), o la proteína quinasa tipo 1 α (93) han mostrado un aumento de la supervivencia así como un mayor rendimiento restaurando la función cardíaca, en comparación con las MSC convencionales en modelos de roedores con infarto de miocardio. Se han evaluado también otros enfoques desde el punto de vista farmacológico para mejorar la retención celular: la timosina β 4 es una proteína implicada en la homeostasis del citoesqueleto que ha demostrado proteger las MSC frente a la hipoxia y aumentar la retención celular en un modelo de infarto de miocardio en rata (94).

En resumen, las MSC son uno de los tipos celulares más prometedores para la reparación cardíaca gracias a nuevos enfoques que priman la funcionalidad de la célula

con resultados alentadores hasta el momento y que han permitido el inicio de ensayos clínicos fase III.

3. Células madre residentes cardiacas

Como ya se ha comentado, el concepto clásico que indicaba que el corazón de un mamífero adulto era un órgano postmitótico sin capacidad de auto-renovación fue cuestionado a principios de la década pasada cuando surgió el hallazgo de mitosis entre cardiomiocitos en corazones humanos después de un infarto de miocardio (7). Poco después, ese mismo grupo de investigación describió la existencia de una población de células multipotentes y clonogénicas que expresaban el receptor de tirosina quinasa en su superficie (c-kit +) y que podían diferenciarse en los tres linajes cardiacos (cardiomiocitos, células de músculo liso y células endoteliales) (95). Desde entonces, se han descrito pruebas sólidas que respaldan el concepto de que las células madre cardiacas (CSC) proporcionan un recambio en la población de cardiomiocitos adultos (9, 96), pero la magnitud de éste y sus mecanismos subyacentes exactos siguen siendo desconocidos (97). Se ha demostrado que las CSC se activan rápidamente después de lesiones miocárdicas o estímulos fisiológicos (98-100) y un modelo murino evidenció que los nuevos cardiomiocitos generados después de una lesión miocárdica eran descendientes de CSC c-kit + (101); no obstante, otros estudios sugieren que los nuevos cardiomiocitos así generados son funcionalmente insignificantes (102); de ello se deduce que otros mecanismos concomitantes deben de estar implicados en la regeneración del miocardio.

En efecto, es evidente que la capacidad de auto-renovación del corazón humano adulto no puede restaurar la gran pérdida celular que se produce después de un evento isquémico.

La terapia celular con CSC ofrece una ventaja fundamental sobre otras células madre: se estima que son más propensas a diferenciarse hacia linajes cardíacos. La mayoría de las investigaciones se han centrado en el trasplante de CSC en áreas infartadas y varios estudios preclínicos que utilizan este enfoque en diferentes modelos animales han demostrado la capacidad de las CSC para aliviar la disfunción del ventrículo izquierdo en el infarto de miocardio agudo y crónico (95, 103-107).

Estos resultados prometedores justificaron el paso a la investigación clínica que se materializó por primera vez en forma del ensayo clínico SCIPPIO (NCT00474461). Este estudio demostró que el aislamiento de CSC c-kit + a partir de tejido cardíaco obtenido durante una cirugía de revascularización coronaria y su posterior expansión in vitro era factible (108). La inyección intracoronaria de las células resultantes en pacientes con disfunción ventricular izquierda (FEVI <40%), al menos 3 meses después de la intervención, fue segura y aumentó la FEVI en un 12,3% en comparación con la inicial, redujo el tamaño de la cicatriz y se asoció a mejoras en la calidad de vida y en la clase funcional de la New York Heart Association (NYHA) (108). Estos son datos preliminares publicados de los primeros ocho pacientes incluidos en el estudio; actualmente, se han reclutado hasta 33 pacientes con similares resultados por imagen cardíaca (109). A pesar de que los resultados obtenidos son potencialmente muy interesantes, están lejos de ser

suficientes para modificar en la práctica clínica debido al pequeño número de pacientes incluidos así como la influencia que tiene la propia revascularización coronaria.

Las CSC son escasas en corazones adultos, y aunque su aislamiento y expansión ex vivo son factibles, obtener una disponibilidad a gran escala supone un reto. Con respecto a esto, en 2004, Messina et al (110) describieron por primera vez la formación in vitro de agrupaciones esféricas multicelulares autoadhesivas a partir del cultivo de biopsias cardíacas humanas obtenidas mediante cirugía, que denominaron cardiosferas (CS). Estas CS eran clonogénicas y capaces de producir los tres linajes cardíacos in vitro, e in vivo cuando se trasplantaron en un modelo animal de infarto de miocardio lo que dio como resultado mejoras en la función ventricular (110). Las CS tienen un núcleo de células c-kit + rodeado por progenitores en diferentes etapas del proceso de diferenciación hacia los tres linajes cardíacos principales. Pueden obtenerse también mediante biopsia endomiocárdica percutánea y usarse como fuente de células derivadas de cardiosferas (CDC), una población clonogénica de células mixtas que expresan marcadores de superficie típicos de células madre (c-kit +, CD105 +), no expresan prácticamente marcadores hematopoyéticos y se puede expandir en fibronectina (111). Este abordaje, descrito por Marbán et al en 2007 (111), tiene una ventaja fundamental: se puede conseguir un mayor número de células en un menor tiempo, en comparación con otros métodos para producir CSC (106, 112, 113). En modelos animales de infarto de miocardio, se ha demostrado que las CDC humanas promueven la reparación cardíaca y mejoran la FEVI (111, 114, 115). El mismo grupo realizó una comparación directa entre CDC y otras células madre extracardíacas (incluidas BMMNC, MSC y células madre derivadas de tejido

adiposo –ADSC-) para evaluar su capacidad de reparación miocárdica: in vitro, los CDC mostraron una mejor diferenciación miogénica y un mayor potencial angiogénico y paracrino; in vivo, la inyección de CDC en ratones infartados proporcionó el mayor beneficio funcional (116).

Esta evidencia preclínica condujo a la realización de un ensayo clínico fase I con CDC, el ensayo CADUCEUS. Este estudio incluyó a 25 pacientes con FEVI entre el 25% y el 45%, dos a cuatro semanas después de un infarto de miocardio, que fueron aleatorizados a recibir CDC autólogas (obtenidas mediante biopsia endomiocárdica del ventrículo derecho) por vía intracoronaria o a tratamiento médico óptimo. El objetivo principal de seguridad fue la proporción de pacientes que murieron debido a taquicardia ventricular, fibrilación ventricular o muerte súbita inesperada, o que tuvieron un infarto de miocardio después de la infusión celular, una nueva formación tumoral intracardiaca o un evento cardíaco adverso importante (MACE: Compuesto por muerte, ingreso hospitalario por insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio no fatal). Se analizaron también datos preliminares de eficacia mediante resonancia cardiaca. El tratamiento con CDC autólogas resultó seguro, y se asoció a una reducción en el tamaño de la cicatriz, un aumento del miocardio viable y una mejoría en la contractilidad regional; pero los volúmenes ventriculares y la FEVI no difirieron entre los grupos (117, 118).

Hay que tener en cuenta que tanto el ensayo SCIPPIO como el ensayo CADUCEUS incluyeron una pequeña cantidad de pacientes y, aunque en ambos estudios se invocó una

verdadera reparación del miocardio dañado, el mecanismo de acción subyacente de estas células permanece incierto.

De manera similar a lo que sucede con otros tipos de células madre extracardíacas, las tasas de supervivencia y retención de las CSC y CDC trasplantadas en el entorno hostil del miocardio infartado son bajas, independientemente de la vía de administración (107, 119). Este hecho apoya aún más la hipótesis de un efecto paracrino como otra vía responsable del efecto positivo de las células (120). Para minimizar este problema, se han probado diferentes estrategias en modelos animales:

- ✓ Mohsin et al (121) utilizaron la manipulación genética para administrar el gen de supervivencia Pim-1 quinasa en CSC humanas, lo que resultó en un injerto y diferenciación celular superiores, que condujo a un mayor potencial reparador en comparación con las CSC convencionales en un modelo de ratones inmunocomprometidos. No se hallaron problemas oncogénicos porque el alargamiento de los telómeros inducido por la sobreexpresión de Pim-1 fue transitorio (122).
- ✓ Otra opción para intentar que las CSC sean menos propensas a la apoptosis en condiciones hipóxicas es el precondicionamiento con agentes farmacológicos citoprotectores. Por ejemplo:
 - El tratamiento de CSC con protoporfirina de cobalto reduce la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, mediante la regulación al

alza de hemooxigenasa 1, COX-2 y proteínas antiapoptóticas (BCL2, BCL2-A1 y MCL-1) y una mayor fosforilación de NRF2 (123).

- La protección frente a la hipoxia también se puede lograr mediante el enlace β -O de la N-acetilglucosamina a ciertas proteínas de la vía. El aumento de este sistema de señalización pro-supervivencia de thiamet-G mejoró significativamente la supervivencia de los CDC después de una lesión hipóxica (124).
- La exposición de las CSC a H₂O₂ durante 2 días antes del trasplante estimula la neoangiogénesis en el área peri-infarto después de una lesión de isquemia-reperfusión y podría ser una opción terapéutica viable para prevenir la insuficiencia cardíaca (125).
- La supervivencia y la diferenciación de CDC también pueden mejorarse mediante la liberación controlada de FGF en el miocardio isquémico en un modelo de infarto de miocardio crónico en cerdo, lo que resulta en una mejora funcional significativa (126).

En humanos, el intento de optimización de la supervivencia y retención celulares tras el injerto se planteó en el ensayo clínico ALCADIA. Este estudio evaluó la aplicabilidad de una terapia celular híbrida (administración conjunta intraquirúrgica de células madre cardíacas autólogas obtenidas a partir de biopsias endomiocárdicas y administradas en forma de inyecciones intramiocárdicas, con una formulación de liberación controlada de FGF en forma de lámina de hidrogel biodegradable cubriendo los puntos de inyección sobre el epicardio) en pacientes con cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca. Sus

resultados preliminares se presentaron durante las sesiones científicas de la American Heart Association en noviembre de 2012, pero los finales aún no se han publicado. En este estudio de fase I, abierto, no aleatorizado, se trataron 6 pacientes con disfunción ventricular (FEVI 15 a 45%) de origen isquémico, insuficiencia cardíaca sintomática, viabilidad miocárdica e indicación de cirugía de revascularización coronaria. Un paciente experimentó una oclusión aguda de un injerto coronario 3 semanas después de la cirugía y otro un episodio de descompensación de insuficiencia cardíaca durante un año de seguimiento. A los 6 meses, se registraron un aumento en la FEVI y de la capacidad máxima de ejercicio aeróbico así como una reducción del tamaño del infarto. Sin embargo, el ensayo ALCADIA es un pequeño estudio preliminar sin grupo control, en el que, además, las tendencias favorables pueden atribuirse a los efectos de la revascularización; por lo que no se pueden derivar conclusiones sobre la eficacia de esta terapia híbrida. Sí que es interesante el concepto que plantea ya que la mala supervivencia celular es actualmente uno de los principales obstáculos que limitan la efectividad de las terapias celulares, independientemente del tipo de célula utilizada. Los enfoques de ingeniería de tejidos pueden ofrecer una solución a este problema. En cuanto a las CSC utilizadas, se debe tener en cuenta que no existe evidencia convincente de que estas células puedan diferenciarse en cardiomiocitos in vivo y la mayoría de los estudios experimentales sugieren un mecanismo de acción paracrino, que conduce a un aumento de los mecanismos de reparación endógenos (tanto la proliferación de cardiomiocitos como el reclutamiento de células madre residentes cardíacas).

Finalmente, los hallazgos anteriormente expuestos sugieren que uno de los mecanismos por los cuales las MSC promueven la reparación cardíaca es también la estimulación de las CSC endógenas a través de los efectos paracrinos (127). Este hallazgo planteó la cuestión de si la combinación de MSC y CSC podría amplificar la respuesta a la terapia celular. Esta hipótesis ha sido abordada por Williams et al (128), encontrando que la administración intramiocárdica de CSC humanas y MSC de médula ósea en un modelo porcino de infarto de miocardio dio como resultado un aumento 7 veces mayor del injerto celular así como una reducción del tamaño de la cicatriz 2 veces mayor en comparación con cada estirpe celular utilizada de forma independiente, lo que lleva a mejoras en la FEVI.

La experiencia clínica temprana con CSC/CDC justifica una investigación adicional con ensayos fase II, más amplios, prospectivos, aleatorizados y controlados con placebo que aborden los problemas no resueltos de SCPIO, CADUCEUS y ALCADIA.

4. Células madre alogénicas para la reparación cardíaca

La terapia con células madre alogénicas puede ofrecer importantes ventajas en la medicina regenerativa cardíaca.

- ✓ En primer lugar, las células alogénicas podrían usarse como un producto celular escalable y fácilmente reproducible, comercializable, disponible en cualquier momento evitando los retrasos inherentes al aislamiento y el cultivo de células madre autólogas.

- ✓ En segundo lugar, este tipo de células puede obtenerse de donantes jóvenes y sanos, evitando así el deterioro mencionado anteriormente en la funcionalidad de las células madre autólogas consecuencia de la edad avanzada y las comorbilidades del paciente.

La mayoría de las investigaciones en reparación cardíaca alogénica se han realizado con MSC debido a su perfil inmunoprivilegiado y sus propiedades inmunosupresoras: carecen de expresión de complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (129), regulan a la baja la respuesta de las células T a través del contacto directo y la secreción de citoquinas antiinflamatorias (130), y afectan significativamente a la capacidad de las células dendríticas para estimular las respuestas de las células T (131). Estos hallazgos acrecentaron el interés en las MSC para el trasplante de células madre alogénicas. No obstante, estudios recientes han demostrado que bajo cierto entorno inflamatorio y durante su proceso de diferenciación, las MSC pueden cambiar su fenotipo inmunitario hacia un patrón de mejora inmunológica, limitando así su supervivencia y beneficios a largo plazo (132, 133). Sin embargo, la terapia con células madre autólogas enfrenta el mismo problema, y si, como se ha defendido anteriormente, el efecto paracrino es responsable de la capacidad reparadora de las células madre, la supervivencia y el mantenimiento de éstas en el corazón trasplantado podrían no ser indispensables (134).

Existe una gran cantidad de trabajo preclínico que respalda la seguridad y la eficacia de la terapia con MSC alogénicas (77, 135-138). En un modelo de infarto de miocardio en cerdos, Amado et al (135) demostraron que las inyecciones de MSC alogénicas en el área

necrótica eran factibles sin evidencia de rechazo y proporcionaban una casi normalización de la función cardíaca, y Quevedo et al (77) consolidaron estos resultados en un modelo porcino de cardiopatía isquémica crónica, en el que las MSC alogénicas eran capaces de diferenciarse en los tres linajes cardíacos y mejorar la FEVI. Estos hallazgos respaldaron el primer ensayo clínico en humanos que utilizó MSC alogénicas: Hare et al (139) llevaron a cabo un ensayo fase I, doble ciego y controlado con placebo, en el que se aleatorizaron 53 pacientes con infarto de miocardio reperfundido a la administración intravenosa de MSC alogénicas humanas o placebo. El estudio cumplió su objetivo primario de seguridad sin evidenciarse formación tumoral ni inmunogenicidad. También sugirió un mayor beneficio en la función cardíaca en los casos de infartos más grandes y mejoría pronóstica con respecto a las arritmias y el rendimiento pulmonar (139). El mismo grupo realizó posteriormente una comparación directa entre las MSC autólogas y alogénicas en un ensayo piloto fase I-II, aleatorizado, que involucró a 30 pacientes con disfunción ventricular izquierda de origen isquémico: el ensayo POSEIDON (140). En este caso, la terapia celular se administró mediante inyección transendocárdica. Ambas terapias fueron seguras, con una sensibilización nula o insignificante incluso en el grupo alogénico y sin evidencia de formación de tejido ectópico; y, ambos tipos celulares redujeron el tamaño del infarto, pero no se documentaron mejoras significativas en la fracción de eyección. Curiosamente, las MSC alogénicas redujeron los volúmenes telediastólicos del ventrículo izquierdo, mientras que las autólogas no; por otro lado, las mejoras en la calidad de vida, NYHA y en el test de la marcha de los 6 minutos fueron más evidentes con la terapia autóloga. Sin embargo, el pequeño número de pacientes y la ausencia de un grupo placebo

hacen que estas observaciones sean difíciles de interpretar. Un hallazgo interesante fue el mayor beneficio con respecto a los volúmenes del ventrículo izquierdo y la FEVI obtenidos con concentraciones menores de MSC frente a dosis altas (20 millones frente a 200 millones), lo que concuerda con los datos preclínicos (141) y justifica una investigación adicional de la dosis óptima antes de emprender ensayos clínicos más amplios.

Las células precursoras mesenquimales (MPC) representan una subpoblación inmadura de células derivadas de la médula ósea identificables a través del anticuerpo monoclonal Stro3⁺ (142); son células multipotentes con una amplia capacidad proliferativa y de diferenciación, así como un gran potencial paracrino que supera al de las MSC (143, 144). También muestran un fenotipo inmunoprivilegiado, apropiado para el trasplante alogénico. Estudios previos en animales han proporcionado evidencia sobre el efecto positivo de estas células en el contexto del IAM cuando se administran por vía intramiocárdica (141, 144, 145) o por infusión intracoronaria (146). Houtgraaf et al (146) evaluaron la infusión intracoronaria de diferentes dosis de MPC alogénicas pocos minutos después de la reperusión en un modelo ovino de infarto de miocardio. La terapia fue segura y proporcionó reducciones en el tamaño del infarto a través del rescate y la proliferación de cardiomiocitos y de la angiogénesis inducida. También se sugirió que el tamaño más pequeño de las MPC, en comparación con las MSC, podía prevenir la obstrucción microvascular debido a la agregación celular observada en estudios anteriores. De manera similar a los hallazgos del ensayo POSEIDON, el beneficio fue más evidente en el grupo de dosis baja (<75 millones vs 200 millones), una observación que

puede estar relacionada con el mejor flujo coronario observado después de la infusión con un número menor de células.

Recientemente, Penn et al (147) probaron un producto celular alogénico derivado de médula ósea diferente, llamado MultiStem, en 19 pacientes con IAM, utilizando un nuevo método de administración. Tres dosis diferentes de células se inyectaron con una microaguja en la adventicia de la arteria responsable del infarto dos a cinco días después de una angioplastia primaria. El procedimiento fue seguro y la FEVI se incrementó en comparación con los controles.

Aunque el perfil de seguridad de las MSC o MPC alogénicas ha sido excelente, los resultados de eficacia han sido menos consistentes. Por ello, estudios preclínicos han abierto la puerta a la terapia alogénica con estirpes celulares más “evolucionadas”. Se han estudiado CDC alogénicas en un modelo de IAM en rata sin inmunosupresión, observando que el trasplante era seguro y daba lugar a una mejoría en la función cardíaca (148). De forma similar, la administración de CS alogénicas en un modelo de rata produjo un aumento del miocardio viable con la consiguiente atenuación del remodelado adverso y, con ello, mejoría de la función cardíaca (149). Los efectos cardioprotectores de las CDC y las CS alogénicas permanecieron durante al menos 6 meses, aunque las células implantadas habían desaparecido en 4 semanas (148, 149). Además, la infusión de CDC alogénicas en un modelo de IAM en minipigs de Yucatán se asoció también con una disminución del tamaño de la cicatriz, un aumento del miocardio viable, atenuación del remodelado y mejoría de la función global y regional en comparación con el placebo 2

meses después del tratamiento (150, 151). Ante estos datos, se diseñó el ensayo clínico ALLSTAR como un estudio multicéntrico fase I-II para valorar la seguridad y eficacia de la infusión intracoronaria de CDC alogénicas (CAP-1002) en pacientes con disfunción ventricular izquierda consecuencia de un infarto de miocardio sufrido entre 1 y 12 meses antes de la inclusión en el estudio (152). En una primera fase de seguridad, abierta, no aleatorizada, se reclutaron 14 pacientes a los que se administraron dosis progresivas del producto celular. En una segunda fase, doble ciego, controlada con placebo, se aleatorizaron a 120 pacientes a recibir la dosis máxima de CDC alogénicas por vía intracoronaria o placebo (asignación 2:1). El objetivo primario para ambas fases era la seguridad al primer mes, y el criterio de valoración principal de la eficacia durante la segunda fase era el cambio en el tamaño del infarto a los 12 meses (152). Los resultados obtenidos a los 6 meses se presentaron en las sesiones científicas anuales de la American Heart Association celebradas en Los Ángeles en noviembre de 2017 (153), la técnica resultó segura con un porcentaje de eventos adversos mayores similar en ambos grupos, pero no se demostró la eficacia esperada (sin cambios que alcanzasen significación estadística en cuanto al tamaño del infarto o los volúmenes del ventrículo izquierdo). Los resultados finales aún no han sido publicados.

En resumen, la terapia celular alogénica representa un nuevo enfoque en la reparación cardíaca que podría superar algunas de las fuertes barreras que encuentran los productos celulares autólogos; sin embargo, quedan por confirmarse la ausencia de problemas derivados de la inmunogenicidad así como valorarse la verdadera eficacia del producto.

5. Otros tipos celulares

A diferencia de las células madre adultas, las células madre embrionarias (ESC) son pluripotentes, es decir que tienen la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales. Las ESC aisladas de blastocistos muestran un gran potencial para generar cardiomiocitos funcionales, y se ha evaluado su trasplante en corazones infartados de modelos animales evidenciando mejoras en la función del ventrículo izquierdo (154, 155). A pesar de estos hallazgos, las terapias basadas en ESC se enfrentan a fuertes barreras que van más allá de los aspectos biológicos, como el rechazo inmune o la formación de tumores, los problemas éticos siguen siendo una limitación importante para el uso generalizado de estas células.

Dadas estas restricciones, Takahashi y Yamanaka publicaron en 2006 la posibilidad de generar células madre pluripotentes inducidas (iPSC), con un fenotipo similar al de las ESC, a partir de fibroblastos de ratón adulto mediante la transducción de cuatro factores de transcripción (156). Este logro podía prevenir los problemas de inmunogenicidad inherentes a la aplicación de ESC alogénicas, pero no evitaba los riesgos oncogénicos (157). Además de esto, la reprogramación actual de las células somáticas es un proceso de baja eficiencia que debe refinarse mucho antes de aplicarse a ensayos clínicos. Por lo tanto, hoy en día, los iPSC representan una nueva fuente potencial de células para la medicina regenerativa que aún no está lista para uso en seres humanos.

Por otro lado, las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC) también pueden diferenciarse en múltiples linajes celulares, incluidos los cardiomiocitos y las células

vasculares (158). Ofrecen dos ventajas principales: en primer lugar, un acceso fácil y reproducible que permite extraer grandes cantidades de tejido adiposo mediante una técnica mínimamente invasiva y, en segundo lugar, su mayor potencial proliferativo en cultivo (159). La investigación preclínica ha documentado que la administración de ADSC después de un infarto de miocardio mejora la función cardíaca (160, 161), en un rango similar al de las BMMNC (161). En humanos, esta terapia se ha aplicado en los ensayos APOLLO (162) y PRECISE (163). El ensayo APOLLO fue un pequeño estudio fase I-II, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, diseñado para evaluar la seguridad y la viabilidad de la infusión intracoronaria de ADSC en pacientes con IAMCEST extenso. El estudio demostró la factibilidad y seguridad tanto de la liposucción como de la infusión intracoronaria de ADSC después del evento isquémico agudo, y mostró una tendencia hacia una mejor función cardíaca y reducción de la escara (162). El ensayo PRECISE reveló que la inyección intramiocárdica de ADSC en pacientes con angina refractaria no subsidiaria a otros tratamientos mejoraba la tolerancia al ejercicio y la perfusión miocárdica, reducía el tamaño de la cicatriz y preservaba el consumo máximo de oxígeno (163). Sin embargo, los nuevos avances con MSC, el descubrimiento de las CSC y las terapias alogénicas han disminuido el interés inicial en las ADSC.

6. Regeneración cardíaca acelular

Si, como se ha descrito anteriormente, los beneficios de las células madre están mediados por un efecto paracrino y la activación de mecanismos de reparación endógena, la administración exógena de citoquinas y factores de crecimiento implicados en el

proceso de regeneración podría, en teoría, reemplazar el trasplante de células, y utilizarse así un producto más accesible, similar a otros tratamientos biológicos actuales. Nadal-Ginard et al (97) abogan por este tipo de terapia acelular: en un modelo de infarto de miocardio en cerdo, demostraron que la administración intracoronaria de IGF-1 y factor de crecimiento de hepatocitos inducía la reparación miocárdica y mejoraba la función ventricular a través de la activación de CSC c-kit+ endógenas para generar nuevos cardiomiocitos y microvasos (164, 165). Igualmente, se ha utilizado la terapia génica para modular los ejes del receptor 4 de la quimiocina (CXCR4) y el SDF-1 y así promover el reclutamiento de células madre endógenas por el miocardio infartado, con efectos beneficiosos en estudios preclínicos y en ensayos en fase humana (166, 167). A pesar de eso, los mecanismos de regeneración molecular, celular y de tejidos miocárdicos son altamente complejos y están mediados por la interacción de varios factores, que aún no se conocen completamente. Por lo tanto, parece poco probable que la simple administración de uno o dos factores de crecimiento sea capaz de inducir una regeneración cardíaca completa. En otras palabras, se requiere más investigación en este campo para aclarar estos mecanismos y dilucidar si los enfoques acelulares son una opción viable en el futuro.

C) Liberación de las células madre en el corazón

Aunque el efecto paracrino es beneficioso incluso si las células madre trasplantadas no sobreviven a largo plazo, el éxito final de la reparación cardíaca depende de la integración de dichas células en el miocardio lesionado. Sin embargo, los estudios preclínicos

muestran que la retención celular, independientemente de la estirpe, en estas condiciones es escasa (37). Para intentar solventar este inconveniente, se han investigado diferentes vías y tiempos de administración del producto celular.

1. Técnicas de liberación

Las técnicas de administración podrían dividirse en tres categorías: administración intracoronaria, aplicación intramiocárdica (incluidas las inyecciones endomiocárdicas, transepicárdicas y transvasculares) y administración intravenosa (incluido el seno coronario retrógrado (RCV) y las infusiones intravenosas periféricas) (Figura 1). Actualmente, la elección de una técnica u otra no está regulada y depende de las preferencias, por disponibilidad y/o experiencia, de los centros.

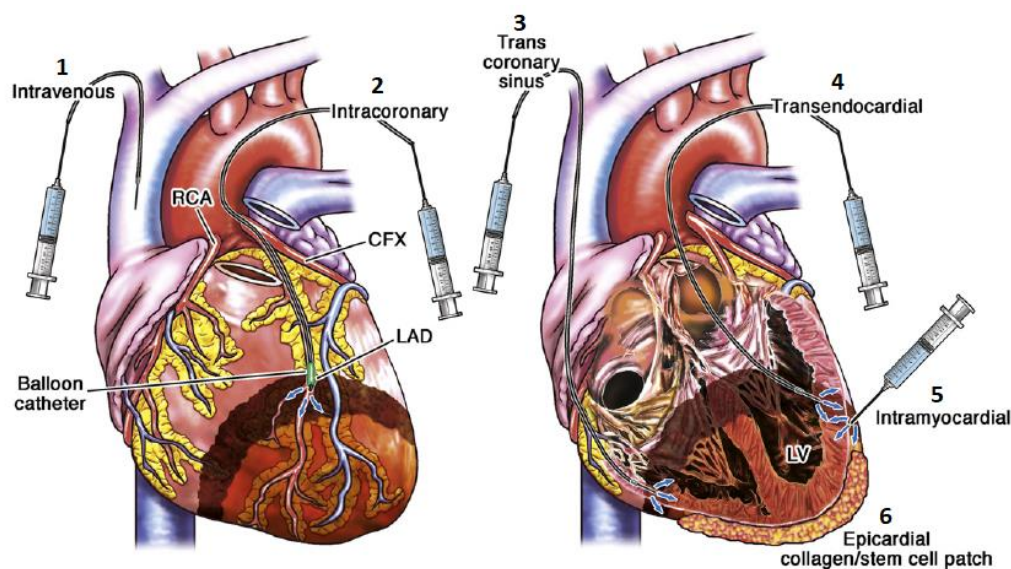


Figura 1. Técnicas de administración de células madre para el tratamiento de enfermedades cardíacas. 1, infusión intravenosa periférica. 2, infusión intracoronaria. 3, infusión retrógrada a través del seno coronario. 4, inyección intramiocárdica transendocárdica. 5, inyección intramiocárdica transepicárdica. 6, administración epicárdica con la ayuda de componentes de bioingeniería. Imagen extraída del artículo de G. Steinhoff publicado en 2017 (168).

a) Infusión intracoronaria

La infusión intracoronaria selectiva se ha utilizado con la intención de minimizar la diseminación a órganos extra-cardiacos (43). Para facilitar el paso transendotelial de las células a trasplantar y su migración a la zona infartada, se utiliza la técnica de “detención del flujo” que consiste en inflar un balón de angioplastia a bajas atmósferas en el segmento proximal de la arteria coronaria culpable del evento isquémico e infundir lentamente las células en ella. También, el proceso de transmigración se facilita en el tejido isquémico y en el viable (169), ya que la isquemia miocárdica local es un potente estímulo para la quimiotaxis de células madre gracias al factor SDF-1 y al receptor CXCR4 (170-172), promoviendo así la extravasación y adhesión celulares en el tejido diana (173, 174). La administración de células madre por vía intracoronaria parece, así, ser suficiente para promover la reparación miocárdica. Sin embargo, el abordaje intracoronario debe reservarse para tipos celulares más pequeños, ya que la utilización de esta vía para estirpes de células cultivadas, como las MSC o los mioblastos esqueléticos, se asocia con microembolización y obstrucción microvascular significativa (175). Además, obviamente, la administración intracoronaria requiere la permeabilidad de la arteria que irriga el territorio lesionado, por lo que su utilización se ve limitada en casos de cardiopatía isquémica crónica con malos lechos vasculares.

b) Inyección intramiocárdica

La inyección intramiocárdica permite el suministro directo del material celular en el área diana del miocardio, sin depender del acceso vascular o de una migración celular

suficiente a través de la barrera endotelial. La aplicación se puede realizar en el centro del miocardio lesionado o en la zona fronteriza entre tejidos viable y no viable, ya que aquí todavía es posible la perfusión y las señales de proximidad pueden ser útiles para la supervivencia, diferenciación e integración de las células madre. En efecto, tras un infarto de miocardio, hay un número limitado de nuevos miocitos presentes en la zona fronteriza pero no en el tejido infartado en sí (9).

Las inyecciones intramiocárdicas pueden aplicarse por vías transendocárdica, transepicárdica o transvascular.

✓ **Inyección intramiocárdica transendocárdica**

La inyección transendocárdica percutánea de preparados celulares generalmente se guía mediante ventriculografía fluoroscópica de rutina o mediante mapeo electromecánico utilizando el catéter de mapeo NogaStar (Biologics Delivery Systems, Diamond Bar, CA). Los catéteres Helix™ y C-Cath™ utilizan imágenes de radioscopia (176-178), variando la retención de células en el miocardio entre el 20 y el 35%. El catéter de inyección Myostar™ está interconectado con el sistema de cartografía endoventricular electromecánica tridimensional NOGA™, el cual, sobre la base de la reconstrucción estructural a través del mapeo de voltaje unipolar en combinación con el mapeo de acortamiento local lineal, permite al operador distinguir en tiempo real entre tejido viable, no viable, hibernante o cicatricial. Los estudios clínicos han establecido la factibilidad y la seguridad de la inyección intramiocárdica transendocárdica en el contexto de insuficiencia cardíaca crónica (179), angina refractaria (180) e infarto de miocardio subagudo (181).

Sin embargo, la pérdida de células y su diseminación a otros órganos aún es considerable con cualquiera de los catéteres de inyección percutánea.

✓ **Administración transepicárdica en forma de inyecciones o con la ayuda de componentes de bioingeniería**

La implantación de células madre durante una cirugía cardíaca generalmente se realiza en áreas isquémicas epicárdicas bien expuestas que permiten múltiples inyecciones dentro y, principalmente, como ya se ha comentado, alrededor del área del infarto con una aguja fina (181, 182). Por lo tanto, este procedimiento se limita a ciertas áreas del ventrículo izquierdo y no se puede usar para los segmentos del miocardio septal. Además, el efecto terapéutico real de la terapia celular es difícil de interpretar cuando se lleva a cabo junto con un procedimiento de revascularización. Por ello, los resultados de los estudios en los que la intervención quirúrgica va destinada únicamente a la aplicación de las células madre son de especial interés (183, 184).

Por otro lado, la bioingeniería ofrece nuevas formas de liberación de células madre sobre la superficie epicárdica (185, 186). Láminas con células estromales derivadas de tejido adiposo dieron como resultado una mejora significativa de la supervivencia y el remodelado del ventrículo izquierdo en un modelo de infarto en ratas en comparación con las inyecciones intramiocárdicas (187). La aplicación de biomateriales se basa en el concepto de que, para sobrevivir, las células trasplantadas requieren un entorno bioquímico y biofísico comparable a la matriz extracelular del miocardio sano. Ésta desempeña un papel fundamental en la angiogénesis, en la diferenciación y maduración de

las células madre y en el injerto mecánico y eléctrico de las células trasplantadas (188). El objetivo es sustituir esa matriz extracelular por dichos biomateriales para favorecer la integración celular. Por tanto, éstos deben tener las propiedades mecánicas y de señalización de la matriz extracelular, y deben ser biodegradables en metabolitos no tóxicos después de un período lo suficientemente largo para permitir una incorporación celular adecuada. Como compuestos, se han utilizado: alginato (189, 190), hidrogel (191, 192), colágeno (193), fibrina (194) o péptidos de autoensamblaje (195); algunos de ellos con efectos beneficiosos en sí mismo, aunque de forma temporal (189-191).

✓ **Aplicación intramiocárdica transvascular**

La administración transvascular, que puede ser transvenosa o transarterial, de células madre se puede llevar a cabo con la ayuda de imágenes de ultrasonido intravascular (IVUS). Se describió el éxito de la aplicación de un hidrogel con células madre por vía transvenosa mediante el catéter de administración TransAccess™ (Medtronic Vascular, Santa Rosa, CA, EE. UU.) (196, 197). Las microagujas de posición perpendicular Mercator Cricket™ y Bullfrog™ (Mercator MedSystems, Emeryville, CA) penetran en la pared de la arteria coronaria y permiten al usuario inyectar células madre directamente en el espacio perivascular (adventicia de la arteria coronaria) (198-200).

c) Administración intravenosa

✓ **Infusión retrógrada a través del seno coronario**

Técnicamente, mediante un acceso venoso femoral, se coloca un balón de angioplastia convencional en la porción media del seno coronario y se liberan distalmente las células madre. Los estudios preclínicos y clínicos han demostrado la seguridad, la eficacia y la alta retención celular que se consigue con la infusión retrógrada a través del seno coronario (201-203). Esta vía de administración podría recomendarse en casos de estenosis aórtica severa, enfermedad arterial periférica grave o en presencia de trombo intraventricular que impiden la inyección transendocárdica percutánea; sin embargo, también se puede utilizar para pacientes con un dispositivo de resincronización. Las posibles complicaciones son la rotura del seno coronario y la embolización (204, 205).

✓ **Infusión intravenosa periférica**

La infusión intravenosa es el método de administración de células madre más seguro y rentable. Su seguridad y viabilidad se ha demostrado en el modelo porcino de infarto de miocardio (206) y, posteriormente, en un estudio clínico de fase I después del suministro de MSC alogénicas (139). El estudio dio como resultado una mejoría significativa de la fracción de eyección en el grupo tratado versus placebo a los 12 meses de seguimiento, aunque la retención del miocardio después de las inyecciones intravenosas es de apenas 0.5% (207).

2. Momento de liberación

La terapia regenerativa se puede aplicar durante varias etapas de la enfermedad cardiovascular. Después de un infarto de miocardio agudo, el remodelado, caracterizado

por fibrosis e hipertrofia, aún no se ha desarrollado y los mecanismos reguladores que conducen a estas condiciones pueden modificarse; por lo tanto, los efectos antiapoptóticos, inmunomoduladores y proangiogénicos de la terapia celular serían máximos si esta se aplica en fases tempranas (208). No obstante, la condición inflamatoria que conlleva la isquemia no favorece la supervivencia celular, la integración celular ni la tolerancia inmunológica. Por lo tanto, la terapia celular aplicada en un tiempo prudencial posterior puede lograr mejores resultados.

D) Aplicación de los conocimientos actuales a nuestro estudio

Como se ha comentado, varios estudios preclínicos (103, 116, 120) y clínicos (108, 117) han evaluado la administración de CSC o de CDC en el contexto del IAM, demostrando que las células progenitoras cardíacas tienen un sólido perfil de seguridad y promueven la reparación del tejido cardíaco, mejorando la función ventricular y limitado el proceso de remodelado adverso. Además, la evolución de la investigación en la búsqueda de células madre adultas más potentes ha llevado al uso de fuentes alogénicas como una de las opciones más atractivas (148, 150, 209). Las células madre alogénicas derivadas de donantes sanos pueden ser estrictamente controladas y fabricadas en grandes cantidades para estar disponibles en el momento deseado, incluso de forma urgente (como puede ser el contexto de un infarto agudo). Los datos preclínicos recientes han indicado que entre todas las células alogénicas, las células madre mesenquimales y las CSC tienen los resultados más prometedores (210), en parte debido a sus propiedades

inmunomoduladoras (211-213) en la zona de infarto donde permanecen durante unas 3 a 4 semanas (149, 213, 214), tiempo que parece suficiente para conferir efectos beneficiosos. Entre los mecanismos implicados, se han identificado:

- ✓ Primero, las CSC alogénicas parecen activar el proceso cardíaco regenerativo endógeno, favoreciendo el reclutamiento de CSC residentes en la zona fronteriza del infarto gracias a la secreción múltiples factores de crecimiento y citoquinas (116, 120).
- ✓ Segundo, estas células expresan niveles medios de antígeno leucocitario humano (HLA) clase I (pero no clase II) y ligando de muerte programada 1 (PD-L1), moléculas coestimuladoras (no CD80/CD86) requeridas para la respuesta linfocitaria Th1/Th2 (214). En el entorno inflamatorio e hipóxico de un IAM, las CSC regulan al alza la expresión de estas moléculas lo que induce una inmunomodulación de las células T reguladoras y una actividad antiinflamatoria de las células asesinas naturales.
- ✓ Y tercero, las CSC alogénicas inducen, por vía paracrina, la protección de los cardiomiocitos y otras células cardíacas en riesgo de apoptosis durante la recuperación de la isquemia (116, 120).

Además, para maximizar los efectos beneficiosos de las CSC, se ha optado por una administración temprana en la fase aguda de la enfermedad, antes de que se forme una cicatriz fibrosa que impida la regeneración del tejido contráctil. Sin embargo, una administración excesivamente precoz (simultánea a la angioplastia primaria o en las

primeras 24 horas del IAM) implicaría dos dificultades principales: por un lado, administrar una terapia novedosa en pacientes inestables; y por otro, perder la posibilidad de seleccionar adecuadamente a los pacientes con mayor riesgo de desarrollo de IC, y por tanto, mayor beneficio potencial de la terapia. Por ello, se ha establecido una ventana para el tratamiento celular de entre 3 y 8 días después del evento agudo; en ese momento, el paciente generalmente ya se ha estabilizado tanto clínicamente como funcionalmente en pruebas de imagen cardíaca, la cicatriz aún no está formada y la modulación del proceso inflamatorio promoverá la reparación cardíaca sin afectar la respuesta inmune temprana requerida para iniciar el proceso de curación. Esto es concordante con los datos preclínicos que informan de una eficacia máxima del tratamiento cuando se administra a los 7 días después de la lesión isquémica (215).

Por otra parte, las CSC alogénicas utilizadas en el ensayo CAREMI (AlloCSC-01) son pequeñas (en promedio de 12,5 μm de diámetro), lo que permite su uso seguro en infusión intracoronaria por la arteria tratada mediante angioplastia primaria (arteria responsable del IAM, y por tanto, la que irriga selectivamente la zona infartada), sin complicaciones esperables a nivel trombótico ni trastornos del flujo epicárdico. Esta terapia ha demostrado su mejor relación beneficio-riesgo cuando se administra en dosis $\leq 50 \times 10^6$ (215).

También es interesante señalar que estas CSC alogénicas indujeron una respuesta inmune muy leve, que no desencadenó el rechazo agudo de las mismas tras su administración intracoronaria. A partir de entonces, el huésped desarrolla una respuesta

inmune más lenta que elimina las células trasplantadas cuando éstas ya han mediado su función reparadora, evitando así efectos secundarios como la tumorigénesis (215).

Como resultado, la terapia celular propuesta en el ensayo clínico CAREMI combina una serie de factores que resultarán en un gran impacto positivo en la salud pública; específicamente:

- ✓ Seguridad: tanto del producto administrado como de su forma de aplicación.
- ✓ Efectividad: limitando el daño ventricular subsiguiente a la isquemia y previniendo el fenómeno de remodelado adverso que finalmente conduce a la insuficiencia cardíaca.
- ✓ Facilidad de administración: mediante una intervención percutánea.
- ✓ Disponibilidad: temprana y a gran escala.

V. HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo de investigación es la siguiente: la administración de una suspensión de células madre cardíacas alogénicas humanas (AlloCSC-01) por vía intracoronaria en pacientes con un infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST y disfunción ventricular consecuente, entre el quinto y el séptimo día posteriores a la reperfusión exitosa es un procedimiento factible y seguro.

VI. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar la factibilidad y seguridad de la administración intracoronaria de CSC alogénicas en fases tempranas tras un IAMCEST en pacientes con alto riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca (IC) en base a la incidencia de muerte por cualquier causa a los 30 días y al objetivo combinado compuesto por muerte por cualquier causa, reinfarto, hospitalización por IC, taquicardia ventricular sostenida, fibrilación ventricular o ictus a los 12 meses.

Los objetivos secundarios son profundizar en la seguridad del tratamiento y evaluar su eficacia:

- Estudiar la seguridad del tratamiento a través de los eventos adversos que forman el objetivo combinado del estudio (muerte por cualquier causa, reinfarto, hospitalización por IC, taquicardia ventricular sostenida, fibrilación ventricular o ictus), la mortalidad por cualquier causa, la mortalidad cardiovascular y los eventos adversos de cualquier etiología.
- Valorar la respuesta inmunológica a la administración de células alogénicas.
- Obtener datos exploratorios acerca de la eficacia del tratamiento tanto a nivel clínico como en términos de imagen cardiovascular y parámetros analíticos.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio es el primer ensayo en humanos aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, en el que se ha inyectado por vía intracoronaria una suspensión de células madre cardíacas alogénicas humanas (AlloCSC-01) en pacientes con un IAMCEST durante la fase aguda de la enfermedad, con un seguimiento posterior de 1 año. Se diseñó como un estudio compuesto de dos fases: una primera fase abierta de escalado de dosis en la que se incluyeron 6 pacientes y una segunda fase aleatorizada doble ciego que contó con 49 pacientes. Han participado ocho hospitales, uno en Bélgica y siete en España. Los correspondientes comités nacionales de ética y las autoridades competentes aprobaron cada centro participante. Coretherapix S.L.U. (parte del Grupo Tigenix, Madrid, España) patrocinó el ensayo, que también fue financiado por el programa europeo FP7-HEALTH-2009 y por la Red Española de Investigación Cardiovascular. El ensayo CAREMI fue registrado con el identificador de ClinicalTrials.gov NCT 02439398.

A) Diseño del estudio

Cumpliendo con las directrices de la Agencia Europea del Medicamento para los primeros ensayos clínicos en humanos, este estudio tenía una primera fase de escalado de dosis (con 6 pacientes) y una segunda fase doble ciego, aleatorizada y controlada con placebo (con 49 pacientes). La fase inicial estaba dedicada a garantizar la seguridad y la

viabilidad del proceso que se utilizaría más adelante durante la fase aleatorizada del ensayo.

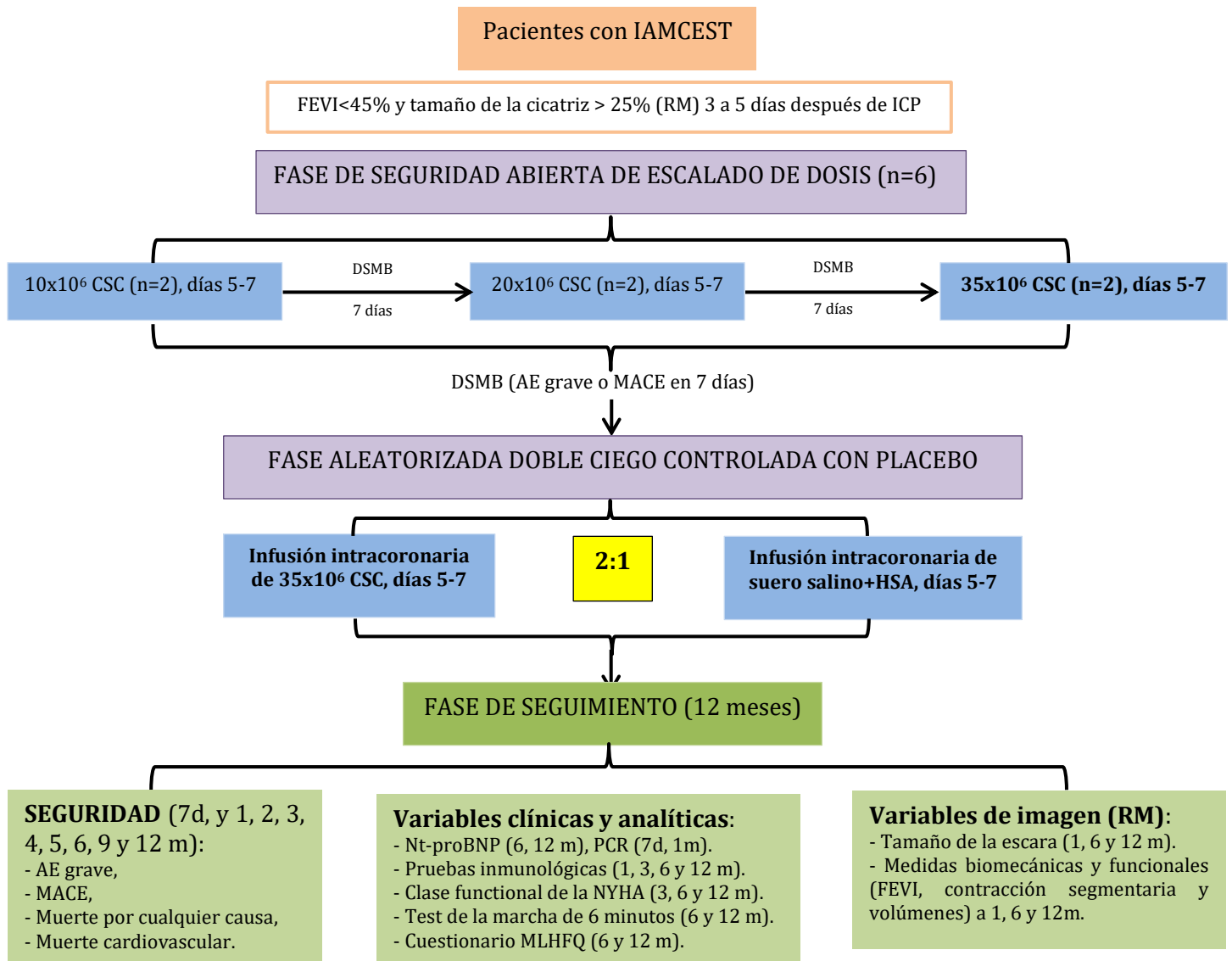


Figura 2. Diseño del ensayo CAREMI (Células madre cardíacas en pacientes con infarto agudo de miocardio). IAMCEST indica infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST; PCR, proteína C reactiva; CSC, células madre cardíacas; DSMB, grupo de monitorización de la seguridad de los datos; HSA, albúmina de suero humano; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; MACE, eventos cardíacos adversos mayores (muerte por cualquier causa, reinfarto, ingreso por IC, taquicardia ventricular sostenida, fibrilación ventricular y accidente cerebrovascular); d, días; m, meses; MLHFQ, Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire; RM, resonancia magnética; NT-proBNP, péptido natriurético cerebral; NYHA, Asociación del Corazón de Nueva York; ICP, intervención coronaria percutánea; SAE, eventos adversos graves.

1. Primera fase abierta de escalado de dosis

Según la normativa vigente, la primera dosis probada durante la fase de escalado inicial debe ser al menos 20 veces menor que la dosis equivalente humana, considerada ésta como la dosis más alta probada en estudios preclínicos sin toxicidad significativa y ponderada por la relación entre el peso del animal y el peso medio de un adulto. Por lo general, esta primera dosis a probar se denomina "dosis segura máxima recomendada" (DSMR). En este caso, y en base a los estudios preclínicos, la dosis objetivo propuesta era de 35×10^6 células, la DSMR era 10×10^6 y el proceso de aumento de la dosis incluía tres pasos (Figura 2): 10×10^6 en los primeros 2 pacientes, 20×10^6 en otros 2 y 35×10^6 en los 2 últimos pacientes. Un seguimiento de 3 días era obligatorio después de la administración celular del primer paciente de cada cohorte específica, así como un seguimiento de 7 días entre cohortes.

2. Segunda fase aleatorizada doble ciego

Después de la evaluación realizada por el comité de monitorización de datos y seguridad, al no observarse eventos de seguridad/toxicidad después de 7 días, se inició la segunda fase doble ciego del estudio, en la que 35×10^6 células era la dosis que se debía utilizar en todos los pacientes, con objetivos de seguridad y eficacia. En esta fase, 49 pacientes se asignaron al azar a recibir AlloCSC-01 o placebo con una relación 2:1 (Figura 2). La administración de las células o el placebo se realizó mediante un procedimiento de inyección intracoronaria idéntico para conservar el ciego tanto en los médicos tratantes como en los pacientes.

B) Población de estudio

1. Pacientes elegibles

Eran candidatos a participar en este estudio, 55 pacientes con IAMCEST y riesgo medio-alto de desarrollar insuficiencia cardíaca, a pesar de tratamiento médico óptimo y una intervención coronaria percutánea exitosa (dentro de las 12 horas posteriores al inicio de los síntomas y con un flujo TIMI - Trombolisis en el Infarto de Miocardio - 3 final). Todos los pacientes incluidos en el estudio cumplían rigurosamente con todos los criterios de inclusión, no presentaban ningún criterio de exclusión (descritos en las tablas 1 y 2, respectivamente) y firmaron el consentimiento informado.

Tabla 1. Criterios de inclusión en el estudio CAREMI.

PRE-SCREENING INICIAL
1. Hombres y mujeres de entre 18 y 80 años.
2. IAMCEST según la definición universal de las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (216).
3. Clasificación Killip ≤ 2 al ingreso.
4. Revascularización exitosa por ICP (TIMI = 3) dentro de las 12 horas siguientes al inicio de los síntomas.
5. FEVI $\leq 50\%$ por ecocardiografía (a las 48 horas del ingreso).
6. Implante de stent convencional o farmacoactivo de 2ª generación en la ICP primaria.
ANÁLISIS DE IMÁGENES OBTENIDAS POR RM (3 A 5 DÍAS DESPUÉS DEL IAM)
7. FEVI $\leq 45\%$, y
8. Tamaño del infarto $\geq 25\%$ de la masa del ventrículo izquierdo.
CARACTERÍSTICAS ANGIOGRÁFICAS
9. La arteria coronaria responsable del infarto queda permeable y es adecuada para la administración del producto en investigación. Se permiten intervenciones percutáneas adicionales para la revascularización de otras arterias coronarias no responsables si se realizan 24 horas antes de la RM de inclusión.
10. El procedimiento de infusión del producto en investigación es técnicamente viable entre los días 5 y 7 post-ICP primaria.
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
11. El paciente se encuentra estable y en condiciones clínicas adecuadas para someterse al procedimiento.

Tabla 2. Criterios de exclusión en el estudio CAREMI.

1. Participación en otro ensayo clínico en los últimos 30 días.
2. Trasplante alogénico previo (se permiten transfusiones de sangre) o tratado previamente con terapia celular o genética.
3. IAM previo con onda Q en cara anterior.
4. Enfermedad valvular significativa previa, pericarditis, antecedentes de taponamiento cardíaco o miocardiopatía.
5. Lesiones severas (> 90%) en una arteria coronaria > 2,75 mm no tratadas por ICP al menos 24 horas antes de la RM basal.
6. FEVI previa ≤45%, NYHA previa >2, o ingreso hospitalario previo debido a IC.
7. Taquicardia ventricular sostenida refractaria o que requiere más de 6 horas para su control, en las 48 horas previas a la administración de producto en investigación.
8. Bloqueo auriculoventricular completo o bloqueo de rama izquierda de nueva aparición, en las 48 horas previas a la administración de producto en investigación.
9. Historia de enfermedad cardioembólica.
10. Recuento de plaquetas <100 000/μL o hemoglobina <8,5 g/dL
11. Insuficiencia renal crónica o aguda con creatinina ≥2.5 mg/dL o aclaramiento de creatinina ≤30 mL/min.
12. Infección con afectación sistémica.
13. Enfermedad tumoral, excepto la erradicada al menos 5 años antes de la inclusión.
14. Enfermedad hepática crónica en estadio C de Child-Pugh.
15. Insuficiencia respiratoria basal que requiere oxígeno domiciliario.
16. Hipertensión arterial no controlada a la inclusión en el estudio (presión arterial sistólica ≥180 mmHg o presión arterial diastólica ≥110 mmHg).
17. Diabetes mellitus mal controlada (Hb1Ac ≥8.5 g/dL) o con afectación grave de órganos diana.
18. Historia de la enfermedad autoinmune.
19. Inmunodeficiencia primaria o adquirida o tratamiento inmunosupresor.
20. Mujeres embarazadas o lactantes o en edad fértil que no utilicen anticonceptivos.
21. Esperanza de vida de menos de 2 años por cualquier motivo.
22. Alergia a los antibióticos aminoglucósidos o hipersensibilidad a la albúmina sérica humana.
23. Contraindicaciones que impiden el uso de la resonancia magnética.

2. Cálculo del tamaño muestral

Al tratarse de un ensayo exploratorio de seguridad en una etapa temprana, no se realizó un cálculo estadístico del tamaño de la muestra sobre la base de una hipótesis *a priori* de superioridad o no inferioridad en términos de eficacia. Por el contrario, fue ideado para explorar la seguridad del procedimiento, lo que significa que la incidencia

esperada de EA se define para esta cohorte, considerando las características de los pacientes y utilizando informes de ensayos observacionales e intervencionistas anteriores. Sobre esta base, se fijó un rango de proporción de EA aceptable, teniendo en cuenta la significación clínica por encima del análisis matemático, lo cual es común en los estudios en fase I-II. Para ello, se utilizaron dos fuentes: la incidencia de EA en ensayos previos de terapia celular aplicada a pacientes con IAMCEST (58, 217) y, una puntuación clínica (218) predictiva del riesgo de mortalidad cardiovascular y hospitalización a corto plazo (30 días) y a largo plazo (1 y 4 años) debido a insuficiencia cardíaca en pacientes que han sufrido un IAMCEST y se han sometido a una ICP primaria (nuestro escenario de referencia).

C) Tratamientos aplicados

1. Asignación del tratamiento

En la primera fase, todos los pacientes recibieron AlloCSC-01.

En la segunda fase, la asignación a placebo o AlloCSC-01 se realizó mediante un sistema de respuesta de voz interactivo automatizado, utilizando el procedimiento PLAN en SAS (versión 9.3) en bloques de 3 (2:1 para CSC y placebo, respectivamente). El equipo encargado del almacenamiento y reconstitución del producto médico en investigación estaba al corriente de la asignación de los pacientes a cada grupo a lo largo del estudio; pero, la presencia de las células en el producto final se enmascaró para el equipo de

intervención con vendajes estériles translúcidos en la jeringa. Como se ha mencionado, los pacientes y todos los evaluadores también fueron cegados en cuanto al tratamiento asignado.

Independientemente del grupo al que perteneciesen, todos los pacientes debían recibir tratamiento médico de acuerdo con las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología para el tratamiento del IAM con elevación del segmento ST (219).

➤ **Placebo**

La incorporación de un grupo placebo ha proporcionado una evaluación más fiable sobre la seguridad y la eficacia de la terapia con AlloCSC-01. Como no se esperaba que los pacientes con placebo obtuviesen ningún beneficio de la terapia, la cohorte de placebo se redujo con una asignación 2:1.

El tratamiento control consistía en la administración intracoronaria de un volumen (18 mL) de albúmina sérica humana al 5% en solución salina, igual al utilizado como diluyente en la terapia celular. Este constituyente se obtenía directamente de un producto ya comercializado (HSA 5% Octapharma®) aspirando directamente a la jeringa cegada en el servicio de reconstitución designado en el hospital.

El protocolo de administración para inyección de placebo era idéntico al utilizado para la administración de AlloCSC-01. El perfil de seguridad de este procedimiento se anticipaba similar a la evaluación del flujo sanguíneo coronario mediante coronariografía.

➤ **Producto médico en investigación (IMP)**

AlloCSC-01 es una suspensión de CSC humanas alogénicas en solución salina con un 5% de albúmina humana (volumen final de 18 mL). Las células fueron aisladas de biopsias de corazón humano (generalmente orejuelas de la aurícula derecha) donadas por 3 pacientes sometidos a una cirugía cardíaca (intervenciones de reemplazo valvular), tras proporcionar el correspondiente consentimiento informado.

Las muestras de tejido, enviadas a un centro con certificado de Buenas Prácticas de Fabricación (3P Biopharmaceuticals, Noáin, España) para su procesamiento, fueron troceadas en pequeños fragmentos y tratadas con collagenasa tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NL). Las CSC se obtuvieron después de la inmunodepleción de las células CD45+ y la inmunoselección de las células CD117+ (c-kit+) utilizando microperlas específicas, (Miltenyi Biotech, Bergish, Glabach, Alemania) y se expandieron en 5 fases. Durante el proceso de fabricación, AlloCSC-01 cumplió con los estándares de seguridad y calidad en cuanto a número de duplicaciones de la población, tiempos de duplicación, estabilidad genómica (por hibridación genómica comparativa) y pruebas de esterilidad, que se evaluaron en cada lote según las pautas de la Agencia Europea de Medicamentos. Se realizaron también caracterizaciones fenotípicas y funcionales de las células en los 3 lotes finales para asegurar la bioequivalencia antes de iniciar el ensayo. El producto terminado se almacenó congelado en contenedores de crioconservación con nitrógeno líquido hasta la liberación de cada lote celular para su uso clínico.

2. Protocolo de aplicación del tratamiento

El tratamiento asignado se administró de 5 a 7 días después de la reperusión exitosa del IAM por ICP (es decir, ≤ 8 días desde el inicio de los síntomas) y preferiblemente dentro de un período máximo de 3 horas después de la reconstitución del producto a infundir, mediante una inyección intracoronaria que se describe a continuación.

Por punción arterial, se coloca un introductor de 6F a través del cual se avanza un catéter guía que se coloca en el origen de la arteria coronaria responsable del IAM. Guiado por una guía de angioplastia, se posiciona el extremo distal de un microcatéter de infusión (Progreat; Terumo Interventional Systems, Tokio, Japón) a nivel del stent implantado durante la angioplastia primaria. Después de un lavado adecuado, un filtro de 40 μm (para atrapar los eventuales agregados celulares) se conecta por un lado al extremo proximal del microcatéter y por el otro a una llave de paso de 3 vías, que a su vez está conectada distalmente a una jeringa luer-lock cargada con el tratamiento a aplicar homogeneizado previamente mediante el movimiento manual de la jeringa. En el puerto lateral de la llave de paso de 3 vías, se conecta otra jeringa cargada con solución salina para purgado (Figura 3). El producto (AlloCSC-01 o placebo) se administra en 3 bolos consecutivos de 6 mL mediante infusión manual durante 3 minutos, con un período de descanso de otros 3 minutos entre cada bolo. Antes de los bolos, se administran 200 a 400 μg de nitroglicerina y, después de cada bolo, se utiliza 1 mL de solución salina para purgar todo el sistema (3 mL en lugar de 1 mL después del último bolo).

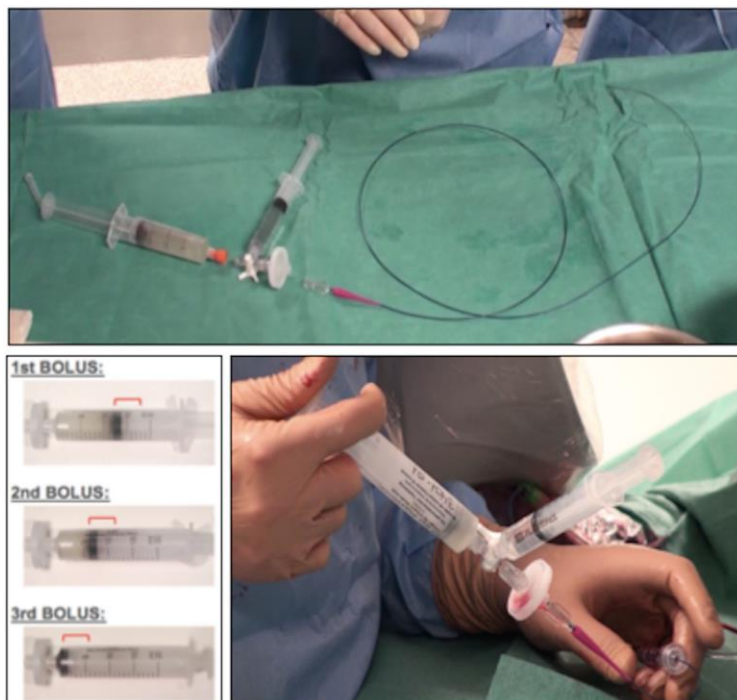


Figura 3. Configuración del material de intervención para la infusión intracoronaria del medicamento en investigación: microcatéter, filtro y 2 jeringas (solución salina y células/placebo). Abajo a la izquierda: esquema de infusión en 3 bolos manuales.

D) Variables de medida utilizadas

1. End-point principal

Con el objetivo de demostrar la seguridad del procedimiento en estudio, se analizaron los siguientes parámetros:

- ✓ Muerte por cualquier causa en los primeros 30 días.
- ✓ Otros eventos de seguridad:
 - En la fase de escalado de dosis: todos los eventos adversos (EA) por cualquier causa desde la inclusión del paciente en el estudio hasta 7 días después de la administración del tratamiento celular.
 - En la fase aleatorizada: eventos cardíacos adversos mayores (MACE) durante los primeros 30 días posteriores a la administración del tratamiento, definidos como muerte por cualquier causa, reinfarto,

hospitalización por IC, taquicardia ventricular sostenida, fibrilación ventricular o ictus.

2. End-points secundarios

a) Seguridad durante el seguimiento

- En la fase de escalado de dosis, se estudiaron:
 - ✓ EA de cualquier origen o naturaleza que ocurriese durante los primeros 30 días después de la administración de la terapia celular.
 - ✓ MACE a los 6 y 12 meses después del tratamiento.
 - ✓ Muerte por cualquier causa durante todo el seguimiento (12 meses).
 - ✓ Muerte por causa cardiovascular durante todo el seguimiento (12 meses).
 - ✓ Monitorización general de todos los EA de cualquier causa (mensualmente durante los primeros 6 meses y posteriormente trimestralmente hasta cumplir el año de seguimiento).
- En la fase aleatorizada:
 - MACE a los 6 y 12 meses después del tratamiento.
 - Muerte por cualquier causa durante todo el seguimiento (12 meses).
 - Muerte por causa cardiovascular durante todo el seguimiento (mensualmente durante los primeros 6 meses, trimestralmente a partir de entonces).
 - Monitorización general de todos los EA de cualquier causa (mensualmente durante los primeros 6 meses, trimestralmente a partir de entonces).

b) Eficacia

En ambas fases del estudio, se evaluaron los siguientes parámetros:

- **Análisis de imágenes por resonancia magnética cardíaca (RM).** Los siguientes parámetros se comparaban entre el grupo tratado con placebo y el tratado con CSC:
 - ✓ evolución del tamaño del infarto (como porcentaje de la masa del VI, y sus cambios a los 6 y 12 meses en comparación con las imágenes de la RM realizada en el momento de la inclusión del paciente en el estudio),
 - ✓ evolución de los parámetros biomecánicos (volúmenes telesistólico y telediastólico indexados por la superficie corporal) y su porcentaje de variación a los 6 y 12 meses en comparación con la inclusión,
 - ✓ score de contracción segmentaria de la pared del VI (normal / hipocinesia / acinesia / discinesia) y engrosamiento sistólico por segmento, en un modelo de 16 segmentos,
 - ✓ cambio absoluto de la FEVI.

Todos los análisis de resonancia magnética se realizaron en un laboratorio central y ciego en el hospital universitario de Lovaina, Bélgica.

- **Parámetros clínicos y de laboratorio.**
 - ✓ Fracción N-terminal del péptido natriurético cerebral (Nt-proBNP) o curva del péptido natriurético cerebral (BNP), según la práctica clínica habitual en cada hospital. Los niveles de Nt-proBNP o BNP se evaluaron justo antes de la

administración del tratamiento y a los 6 y 12 meses posteriores a la administración del producto.

- ✓ Los niveles de proteína C reactiva (PCR) se evaluaron justo antes de la administración del tratamiento, en el momento del alta hospitalaria, 7 días después del tratamiento y 1 mes después de la administración del producto.
- ✓ Se realizó un test de marcha de 6 minutos en el momento del alta del paciente y a los 6 y 12 meses tras la administración del producto.
- ✓ La escala sintomática de IC de la New York Heart Association (NYHA) también se evaluó cuando el paciente fue dado de alta del hospital y 3, 6 y 12 meses después de la administración del producto.
- ✓ El cuestionario de calidad de vida de Minnesota Living with Heart Failure (MLHFQ) se realizó antes de que el paciente fuese dado de alta del hospital y 6 y 12 meses después de la inyección del producto.

c) Vigilancia inmunológica

Debido a que se administraron CSC alogénicas, los parámetros inmunológicos celulares y humorales también debían evaluarse con fines de seguridad y eficacia (inmunomoduladores). Éstos incluyeron la tipificación HLA tanto de las células del donante como del receptor, la comparación cruzada entre las células y el suero del paciente, la detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA de clase I y clase II antes y después del tratamiento.

E) Seguimiento

Después de la inyección de AlloCSC-01/placebo, los pacientes fueron monitorizados para observar el ritmo cardíaco, los cambios electrocardiográficos (ECG) y la liberación de biomarcadores y marcadores inflamatorios. Tras 24 horas de observación post-procedimiento, se pudieron dar de alta hospitalaria. Las visitas programadas para el seguimiento clínico, bioquímico, inmunológico y de imagen incluyeron evaluaciones a la semana y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 12 meses después de la infusión del producto en estudio (detalladas en la figura 2 y en la sección de objetivos).

F) Análisis estadístico

Tanto los subconjuntos de análisis como el análisis estadístico se definieron completamente antes del desenmascaramiento de los tratamientos asignados en un Plan de Análisis Estadístico.

Como ya se ha comentado, dado el carácter exploratorio de seguridad del estudio, no se realizó un cálculo estadístico del tamaño muestral en base a una hipótesis de superioridad o no inferioridad en términos de eficacia; sin embargo, el poder del estudio se probó a priori para asegurar una sensibilidad suficiente para detectar diferencias en cuanto al tamaño del infarto en la magnitud reportada previamente en el ensayo Caduceus (117).

El análisis estadístico incluyó a todos los pacientes de la fase aleatorizada doble ciego (que recibieron AlloCSC-01 o placebo) y a los últimos 2 pacientes de la fase de escalado de dosis, que recibieron 35×10^6 CSC, para la evaluación de todos los resultados de seguridad y EA. Para la valoración de los datos de eficacia, se definieron dos subanálisis: uno basado en el principio de intención de tratar (AIT) que incluía a todos los pacientes aleatorizados, excepto aquellos que no recibieron la medicación del estudio y aquellos de los que no teníamos más datos que los basales; y otro por protocolo (APP) que incluía a todos los pacientes del conjunto AIT que no tuvieron ninguna violación importante del protocolo. Dado que los resultados del APP no difirieron significativamente de los del AIT, se presentan únicamente éstos últimos.

Al no existir pérdidas en el seguimiento con respecto a los objetivos primarios (de seguridad), las tasas de eventos se calcularon utilizando los porcentajes observados, y el efecto del tratamiento se estimó por la diferencia en las tasas de eventos entre los 2 grupos a los 6 y 12 meses con un intervalo de confianza exacto del 95%. La comparación entre los 2 grupos de tratamiento se realizó utilizando una prueba exacta de Fisher. Los objetivos de seguridad secundarios se analizaron utilizando la metodología de Kaplan-Meier, utilizando el estadístico Z para calcular los valores del intervalo de confianza al 95% y de la *P*.

Los datos secundarios de eficacia se analizaron con un modelo restringido de análisis longitudinal de datos utilizando ecuaciones de estimación generalizadas (220). Las correlaciones entre visitas se modelaron utilizando una matriz de varianza-covarianza no

estructurada. A pesar de que faltaban algunos datos puntuales, principalmente debido a la mala calidad de la imagen de RM o la reticencia de los pacientes a realizarse dicha prueba, las ecuaciones de estimación generalizadas proporcionan estimaciones imparciales del efecto del tratamiento en presencia de estas ausencias, siempre y cuando éstas sigan un patrón de azar. Para el principal objetivo de eficacia, el tamaño del infarto (como porcentaje de la masa del VI) a los 12 meses, se realizaron los siguientes análisis de subgrupos exploratorios definidos a priori: edad, FEVI, tamaño del infarto, arteria responsable del infarto, presencia de obstrucción microvascular o de hemorragia miocárdica por RM, e identidad del donante. Dado que el objetivo de este estudio era demostrar la viabilidad y seguridad del tratamiento propuesto, no hubo hipótesis definidas a priori sobre su eficacia. Por lo tanto, el propósito de los análisis de eficacia era la estimación de los resultados y de sus diferencias entre los grupos de tratamiento.

Aunque este estudio tenía dos objetivos primarios, un aumento en el error de tipo I > 5% debido a múltiples pruebas no se consideró un problema, ya que se trataba de un estudio de seguridad: aumentar la posibilidad de detectar un evento de seguridad al no ajustar el nivel de significación (es decir, al 2,5%) puede considerarse un enfoque conservador. Por lo tanto, no se realizaron ajustes para pruebas múltiples, y los dos objetivos primarios se evaluaron a un nivel de significación del 5%. Para los objetivos secundarios de eficacia, debido a la naturaleza exploratoria de su análisis, no se realizó ningún ajuste para comparaciones múltiples.

Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS (versión 9.41).

VIII. RESULTADOS

A) Bioequivalencia entre los lotes celulares

La caracterización fenotípica de AlloCSC-01 (tabla 3) se realizó mediante:

- Citometría de flujo: La expresión de marcadores de superficie celular se analiza utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: SSEA-1 purificado (Millipore), CD166, CD45 conjugado con isotiocianato de fluoresceína, CD90 (Thermo Scientific), CD11b conjugado con ficoeritrina (AbD Serotec), CD34 y CD44 (eBioscience). La tinción indirecta se realiza con anticuerpos anti-ratón inmunoglobulina G (CD166) o inmunoglobulina M (SSEA-1) conjugados con ficoeritrina. Todos los anticuerpos, excepto los indicados, se compran en BD Pharmingen.
- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR cuantitativa): Se lleva a cabo en el sistema StepOnePlus de Applied Biosystems utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (2x concentrado; Life Technologies) y TaqMan Gene Expression Assays (20x concentrado; Life Technologies). Se utilizan los siguientes ensayos de expresión génica para humanos TaqMan: c-kit Hs00174029_m1, CD31 Hs00169777_m1, FLK-1 Hs00911699_m1, GATA4 Hs00171403_m1, GUSB Hs99999908_m1, NKx2.5 Hs00231763_m1, SOX17 Hs00751752_s1, TBX5 Hs00361155_m1, y la telomerasa transcriptasa inversa Hs00972656_m1. GUSB se utiliza como gen endógeno.
- ELISA.

El IMP utilizado en este estudio se aisló de 3 donantes diferentes (un hombre de 66 años y 2 mujeres de 44 y 62 años). Estos 3 lotes mostraron niveles de expresión comparables (positivos o negativos) de marcadores de superficie de progenitor cardíaco, mesenquimatoso, endotelial y hematopoyético.

Tabla 3. *AlloCSC-01: Caracterización fenotípica y bioequivalencia de los 3 lotes.*

	MARCADOR	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
Análisis por citometría de flujo (% de células que muestran positividad).	CD90	98.0	97.9	77.1
	CD105	99.8	99.7	99.7
	CD166	99.6	97.7	98.8
	CD146	48.9	60.0	39.1
	SSEA-1	26.0	20.1	34.9
	FSP	6.6	7.0	3.5
	CD144	5.6	1.2	8.6
	CD34	0.2	2.7	1.2
	CD11b	<0.1	0.3	0.3
	CD45	<0.1	0.6	1.3
Análisis por PCR cuantitativa (log2 RQ), comparada con BM-MS.	GATA4	7.5	6.5	5.5
	SOX17	8.6	8.3	7.9
	FLK1	4.8	5.5	4.9
	CD31	1.7	1.2	3.0
	NESTIN	4.8	4.1	4.2
	TBX5	3.8	1.2	1.5
Análisis por ELISA (ng/mL)	CCL2	81.4	41.6	45.7
	HGF	25.9	9.4	3.3
	VEGF	4.45	1.43	2.31
	TGF- β 1	1.64	1.16	2.31
	IGF-1	0.03	0.03	0.06

AlloCSC-01 presentaba positividad para CD90, CD105, CD146, CD166 y SSEA-1 (antígeno embrionario-1 estadio-específico) mientras que carecía de la expresión de CD11b, CD34 y CD45. Además, la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (utilizando MSC como línea celular de control) confirmó la expresión de GATA4, SOX17, FLK1 (quinasa hepática fetal 1), CD31, NESTIN y TBX5 (factor de transcripción 5 de la caja

T). La expresión de GATA4 y SOX17, involucrada en el desarrollo del corazón (221, 222), distingue a la CSC de las células madre mesenquimales y los fibroblastos diploides. La secreción por parte de las CSC de factores solubles implicados en la inmunorregulación, la regeneración cardíaca, la activación de células madre, la angiogénesis o la diferenciación celular se estudió mediante ELISA. Los 3 lotes de AlloCSC-01 expusieron niveles comparables de CCL2 (receptor 2 de quimiocinas), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β), e IGF-1. La capacidad de AlloCSC-01 para activarse en un entorno inflamatorio y para modular la función de las células inmunitarias se caracterizó in vitro (Figura 4).

Los sobrenadantes condicionados de los 3 lotes de AlloCSC-01 promovieron igualmente la migración de monocitos in vitro en un sistema transwell. Las células se activaron por exposición a IFN γ , lo que resultó en una regulación al alza de HLA-I y PD-L1 y en la inducción de IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) y HLA-II. La expresión de PD-L1 e IDO, con importantes propiedades inmunomoduladoras, podría ser relevante para los efectos inmunorreguladores de AlloCSC-01 en el contexto del IAMCEST. Finalmente, los 3 lotes de AlloCSC-01 demostraron una capacidad similar para inhibir la proliferación de linfocitos in vitro.

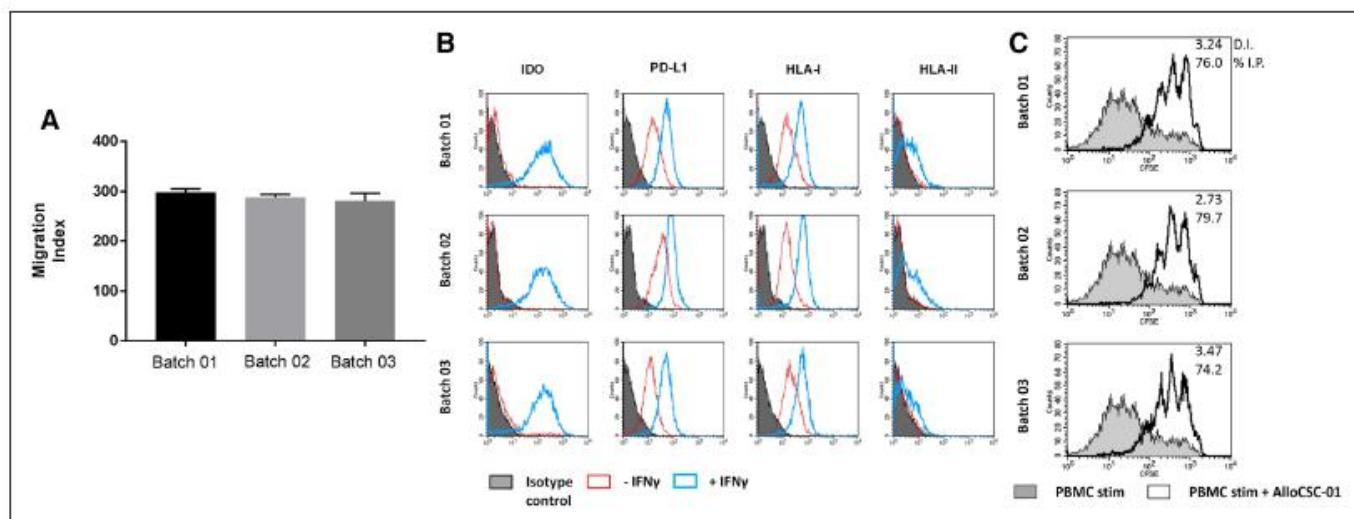


Figura 4. Análisis de bioequivalencia funcional de células madre cardíacas alogénicas (AlloCSC-01) en los 3 lotes. A: Migración de monocitos en respuesta a medios condicionados por CSC (resultados presentados como media \pm DE). B: Expresión de moléculas inmunomoduladoras (IDO, PD-L1, HLA-I, y HLA-II) en AlloCSC-01 en situación basal y tras 24 h de estimulación con IFN γ . C: Capacidad inmunorreguladora de AlloCSC-01, evaluada por la inhibición de la proliferación de linfocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) “DI” indica índice de división; y “% IP”, porcentaje de inhibición de la proliferación.

B) Población de pacientes incluidos en el estudio

Desde junio de 2014 hasta noviembre de 2016, un total de 66 pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito y fueron evaluados para la fase de doble ciego en 7 centros en España y 1 centro en Bélgica (Figura 5). Finalmente, 49 pacientes fueron aleatorizados para recibir AlloCSC-01 (33 pacientes) o placebo (16 pacientes). Dos pacientes asignados al grupo AlloCSC-01 no recibieron ningún tratamiento debido a una estenosis coronaria en la arteria relacionada con el infarto que se consideró una indicación de revascularización antes de la infusión celular y a una retirada del consentimiento. Por lo tanto, el análisis de seguridad se realizó sobre 49 pacientes: 47 pacientes aleatorizados que recibieron la terapia asignada más los dos pacientes no

aleatorizados de la fase de escalado de dosis que recibieron la dosis objetivo de AlloCSC-01. El conjunto de la población para AIT comprendía los 47 pacientes randomizados que completaron la visita de seguimiento de los 12 meses. Tres pacientes en el grupo AlloCSC-01 y ningún paciente del grupo placebo tuvieron violaciones importantes del protocolo, lo que resultó en una población de 44 pacientes para el APP (Figura 5).

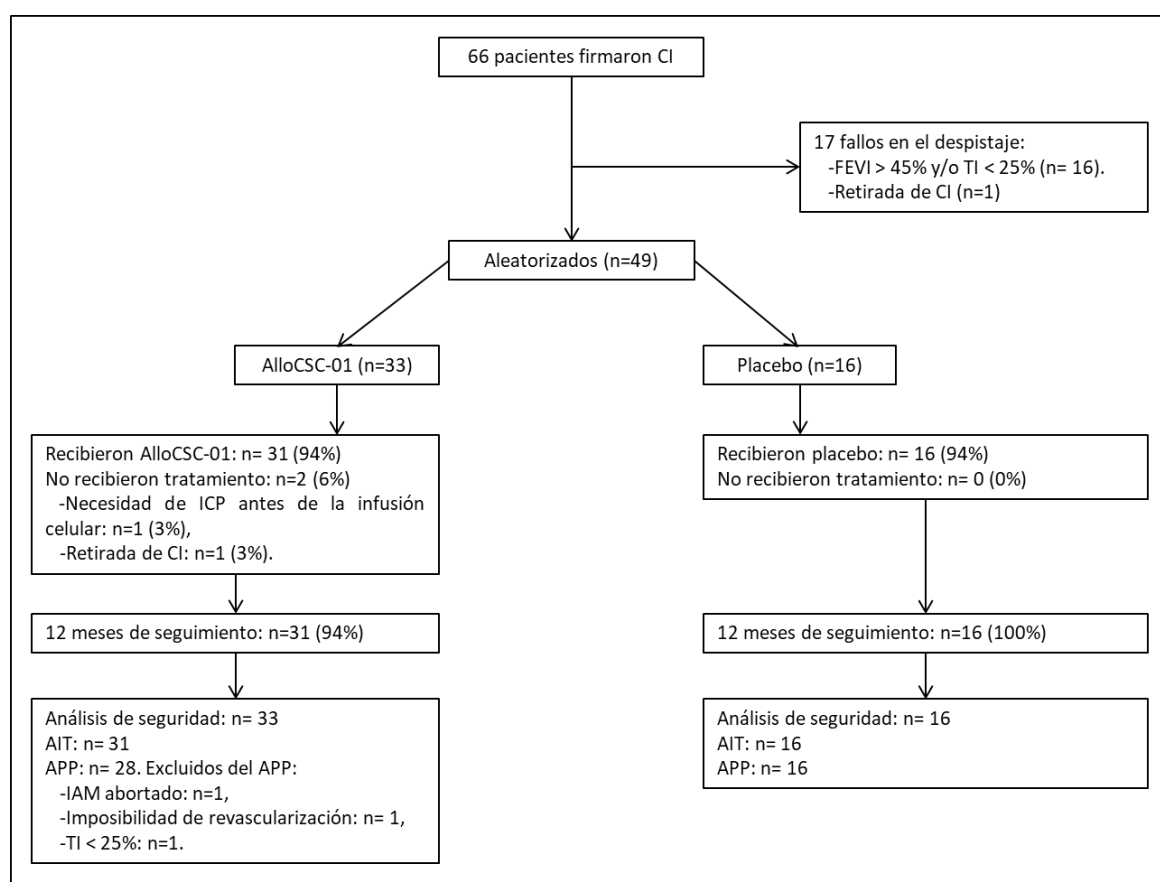


Figura 5. Diagrama de distribución de la población de estudio (pacientes seleccionados, excluidos, aleatorizados y evaluados para el seguimiento clínico). CI indica consentimiento informado; FEVI, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; TI, tamaño del infarto; ICP, intervencionismo coronario percutáneo; AIT, análisis por intención de tratar; APP, análisis por protocolo; IAM, infarto agudo de miocardio.

Las características basales de los pacientes y de la ICP estaban bien equilibradas entre los grupos (Tabla 4). Todas las mujeres incluidas en el estudio fueron asignadas al azar al

grupo AlloCSC-01. Es de señalar que nuestra población incluyó pacientes jóvenes con pocos factores de riesgo (en su mayoría fumadores y con baja prevalencia de diabetes mellitus), predominantemente con enfermedad de un solo vaso y que se sometieron a la revascularización con éxito dentro de las 4 horas posteriores al inicio de los síntomas (Tabla 4).

Tabla 4. Características basales de la población incluida en el análisis de seguridad.

	AlloCSC-01 (n=33)	Placebo (n=16)
ANTECEDENTES CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS		
Edad, años	56±12	55±8
Edad < 55 años, n (%)	14 (45)	9 (56)
Sexo femenino, n (%)	4 (12)	0
Algún FRCV, n (%)	27 (82)	16 (100)
Antecedentes familiares de EAC prematura, n (%)	4 (12)	3 (19)
Hipertensión arterial, n (%)	14 (42)	6 (38)
Hipercolesterolemia, n (%)	13 (39)	5 (31)
DM insulino-dependiente, n (%)	0	1 (6)
DM no insulino-dependiente, n (%)	2 (6)	2 (13)
Fumador activo, n (%)	18 (55)	8 (50)
Exfumador, n (%)	5 (15)	3 (19)
Antecedentes de IAMSEST, n (%)	1 (3)	0
Antecedentes de ICP, n (%)	1 (3)	0
Antecedentes CABG, n (%)	0	0
Enfermedad arterial periférica, n (%)	0	0
Antecedentes de ictus, n (%)	2 (6)	0
Insuficiencia renal, n (%)	1 (3)	1 (6)
EXAMEN FÍSICO		
Peso, kg	81±16	84±12
Frecuencia cardiaca, lpm	76±18	81±15
Presión arterial sistólica, mmHg	131±22	134±22
Presión arterial diastólica, mmHg	78±15	87±18
Clasificación Killip, n (%)		
-Clase I	28 (85)	14 (88)
-Clase II	5 (15)	2 (13)
-Clase III ó IV	0	0

Tabla 4. Características basales de la población incluida en el análisis de seguridad (continuación).

CARACTERÍSTICAS DE LA ICP PRIMARIA		
Estrategia de reperfusión urgente, n (%):		
-ICP primaria	28 (85)	13 (81)
-ICP post-fibrinólisis	5 (15)	3 (19)
Arteria coronaria responsable del IAMCEST, n (%):		
-Descendente anterior	29 (88)	14 (88)
-No descendente anterior	4 (12)	2 (13)
Flujo TIMI en la angiografía previa al ICP, n (%):		
-0	28 (85)	12 (75)
-1	3 (9)	2 (13)
-2	1 (3)	2 (13)
-3	1 (3)	0
Tiempo en minutos desde el inicio de los síntomas hasta la restauración del flujo coronario, mediana (IQR)	216 (150–285)	221 (134–430)
Tipo de stent implantado en la arteria responsable:		
-Stent convencional, n (%)	2 (6)	1 (6)
-Stent farmacoactivo, n (%)	31 (94)	15 (94)
-Diámetro del stent, mm	3.3±0.4	3.4±0.3
-Longitud del stent, mm	22.0±8.1	20.7±9.2
Necesidad de revascularización de arteria coronaria no responsable del IAMCEST antes de la infusión del tratamiento, n (%)	11 (33)	6 (38)

Datos expresados como media \pm desviación estándar, salvo que se indique lo contrario. **No significación estadística para todas las comparaciones entre grupos.** FRCV indica factor de riesgo cardiovascular; EAC, enfermedad arterial coronaria; DM, diabetes mellitus; CABG, cirugía de bypass a arteria coronaria; IQR, rango intercuartílico.

C) Resultados obtenidos en el objetivo primario de seguridad

Los 49 pacientes incluidos en el análisis de seguridad recibieron el tratamiento completo previsto de 35×10^6 CSC o placebo, reconstituido en un volumen a infundir de 18 mL. No se observaron signos de isquemia, anafilaxia, inestabilidad hemodinámica ni arritmias ventriculares. Un paciente en el grupo placebo mostró un flujo TIMI 2 después

de la infusión, pero no se requirió medicación de rescate. La duración media de la infusión fue comparable entre los grupos AlloCSC-01 y placebo (19.0 ± 3.9 vs 19.6 ± 4.8 minutos, respectivamente). Es importante destacar que no se registraron EA, muertes o MACE (muerte por cualquier causa, reinfarto, hospitalización por IC, taquicardia ventricular sostenida, fibrilación ventricular y accidente cerebrovascular) dentro de los 30 días posteriores a la administración del tratamiento en ninguno de los grupos.

D) Resultados obtenidos en los objetivos secundarios de seguridad

Es importante señalar que no se observaron EA fatales durante todo el curso del estudio, ni muertes ni MACE dentro de los 6 y 12 meses posteriores a la administración del tratamiento, en ninguno de los dos grupos; y ningún paciente se retiró del ensayo debido a algún EA.

22 pacientes (67%) en el grupo AlloCSC-01 y 9 pacientes (56%) en el grupo placebo tuvieron un EA durante el primer año. A un paciente en el grupo de placebo se le diagnosticó un carcinoma de células basales, que requirió resección quirúrgica. Entre todos los EA, aquellos que se calificaron como posible o probablemente relacionados con el tratamiento de estudio ocurrieron durante el primer mes, y fueron:

- ✓ En el grupo AlloCSC-01, 3 pacientes sufrieron pirexia, 1 paciente desarrolló un hematoma relacionado con el catéter y 1 paciente una dermatitis alérgica transitoria. Los 3 casos de pirexia se clasificaron como leves a moderados en

intensidad y autolimitados, recuperándose en unas pocas horas. Estos 3 pacientes habían recibido células del mismo lote y donante, y no se detectaron anticuerpos anti-HLA en ninguno de ellos.

- ✓ En el grupo placebo, 2 pacientes desarrollaron una erupción cutánea transitoria.

Durante el estudio, 8 pacientes (24%) en el grupo AlloCSC-01 y 2 pacientes (13%) en el grupo placebo tuvieron un EA grave. Sólo 2 EA graves se consideraron posiblemente relacionados con el tratamiento del estudio (una dermatitis alérgica en el grupo AlloCSC-01 y un episodio de erupción cutánea en el grupo placebo). Ambos ocurrieron dentro del primer mes y se resolvieron espontáneamente sin medidas adicionales. Considerados EA graves pero no relacionados con el tratamiento, se registraron:

- ✓ en el grupo AlloCSC-01, 3 dolores torácicos de origen no cardíaco, una hemorragia digestiva baja, una dermatitis alérgica, un dolor abdominal, una colecistitis aguda y una nefrolitiasis.
- ✓ en el grupo de placebo, un episodio de palpitaciones y una erupción cutánea y celulitis.

En cuanto a los datos de laboratorio, se midieron curvas decrecientes o estables de todos los marcadores cardiacos en ambos grupos tras la infusión del tratamiento asignado:

- ✓ Los niveles de CK (creatina quinasa) disminuyeron progresivamente:

- En el grupo AlloCSC-01, de 227 ± 175 IU/L pre-infusión, a 175 ± 100 IU/L a las 8 horas, y a $151 \pm 62,7$ IU/L a las 24 horas.
- En el grupo placebo, de 153 ± 44.4 UI/L pre-infusión, a 125 ± 41.2 UI/L a las 8 horas, y a 117 ± 30.7 UI/L a las 24 horas).
- ✓ Se observó una tendencia estable para CK-MB (fracción mioglobina de la CK):
 - En el grupo AlloCSC-01: de 2.8 ± 1.5 µg/L pre-tratamiento, a 2.4 ± 1.3 µg/L a las 8 horas, y a 2.8 ± 1.8 µg/L a las 24 horas.
 - En el grupo placebo: de $3.2 \pm 0,8$ µg/L pre-tratamiento, a $2,5 \pm 0,9$ µg/L a las 8 horas, y a $2,7 \pm 0,9$ µg/L a las 24 horas.
- ✓ Se observó una tendencia decreciente de la troponina T:
 - En el grupo AlloCSC-01: de 2.1 ± 1.2 µg/L pre-infusión, a 1.7 ± 1.2 µg/L a las 8 horas, y a 1.3 ± 1.0 µg/L a las 24 horas.
 - En el grupo placebo: de 2.5 ± 1.6 µg/L pre-infusión, a 1.8 ± 1.3 µg/L a las 8 horas, y a 1.6 ± 1.0 µg/L a las 24 horas.

Los exámenes electrocardiográficos fueron representativos de la población de pacientes y no mostraron cambios relacionados con la seguridad ni datos isquemia recurrente durante el procedimiento de infusión ni hasta el alta hospitalaria.

Se realizó un subestudio inmunológico sistemático para detectar anticuerpos anti-HLA en varios momentos después de la infusión intracoronaria de AlloCSC-01. Siete pacientes (14%) tenían anticuerpos anti-HLA preexistentes al inicio del estudio (5 en el brazo de AlloCSC-01 y 2 en el brazo de placebo). Aquellos pacientes presensibilizados que

recibieron AlloCSC-01 tenían una prueba cruzada negativa contra CSC mediante el ensayo de antígeno único de Labscreen y, tras la terapia celular, no aumentó la respuesta humoral preexistente. Después de la administración de AlloCSC-01, 2 pacientes (7%) desarrollaron una respuesta inmunológica consistente en la aparición de anticuerpos anti-HLA específicos contra el donante, según lo confirmó la tecnología de antígeno único (> 20000 de intensidad de fluorescencia estándar). Los niveles máximos de dichos anticuerpos donante-específicos se alcanzaron al cabo de 1 mes en un paciente y a los 3 y 6 meses en el otro paciente, y en ambos casos se habían eliminado a los 12 meses. Ninguno de estos pacientes con anticuerpos preexistentes o que desarrollaron anticuerpos *de novo* experimentaron ningún EA relacionado con hipersensibilidad ni ningún otro EA específico que pueda atribuirse potencialmente a una respuesta inmunogénica.

E) Resultados obtenidos en los objetivos secundarios de eficacia

El tamaño medio del infarto, como porcentaje de la masa del VI, disminuyó con el tiempo en ambos grupos de tratamiento (tabla 5 y figura 6). El cambio absoluto estimado desde el inicio (RM de cribado) hasta el final seguimiento (un año) fue -15.6% (intervalo de confianza del 95%, -18.3% a -12.8%) en el grupo AlloCSC-01 y -13.3% (-16.7% a -9.8%) en el grupo placebo. Por lo tanto, el efecto del tratamiento estimado de AlloCSC-01 sobre los cambios absolutos en el tamaño del infarto fue de -2.3% (-6.5% a 1.9%) en el AIT y de -1.6% (-5.8% a 2.6%) en el APP. Las mayores reducciones en este parámetro principal de eficacia ocurrieron dentro del primer mes después del tratamiento,

independientemente de la asignación al mismo, y sin diferencias significativas entre los 2 grupos a 1 y 6 meses.

Tabla 5. Resultados de los principales objetivos secundarios de eficacia por RM en la población sometida al AIT

	AlloCSC-01 (n=31)	Placebo (n=16)
Tamaño del infarto (%)		
Basal (n)	38.9±9.2 (31)	38.5±9.7 (16)
Primer mes (n)	29.2±11.5 (30)	30.8±11.4 (14)
6 meses (n)	26.8±12.0 (29)	26.9±10.1 (14)
12 meses (n)	22.7±9.9 (30)	25.4±9.3 (15)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al primer mes (intervalo del confianza al 95%)	-9.9 (-12.9 a -6.9)	-9.8 (-14.4 a -5.2)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al 6º mes (intervalo del confianza al 95%)	-12.2 (-15.4 a -9.1)	-10.4 (-14.6 a -6.1)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al 12º mes (intervalo del confianza al 95%)	-15.6 (-18.3 a -12.8)	-13.3 (-16.7 a -9.8)
FEVI (%)		
Basal (n)	37.5±5.1 (31)	36.6±3.4 (16)
12 meses (n)	44.7±8.7 (31)	45.6±5.8 (16)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al 12º mes (intervalo del confianza al 95%)	7.7 (5.1 to 10.2)	8.6 (6.2 to 11.1)
Volumen telesistólico de VI indexado a la superficie corporal (mL/m2)		
Basal (n)	56.9±13.0 (31)	57.7±8.3 (16)
12 meses (n)	56.8±23.0 (31)	54.8±11.9 (16)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al 12º mes (intervalo del confianza al 95%)	0.9 (-5.2 to 7.1)	-3.5 (-9.4 to 2.5)
Volumen telediastólico de VI indexado a la superficie corporal (mL/m2)		
Basal (n)	90.2±15.6 (31)	91.1±11.1 (16)
12 meses (n)	100.4±26.3 (31)	100.3±14.5 (16)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al 12º mes (intervalo del confianza al 95%)	10.1 (3.8 to 16.4)	9.3 (3.0 to 15.6)
Índice de motilidad regional de la pared de VI		
Basal (n)	3.2±0.5 (31)	3.4±0.3 (16)
12 meses (n)	2.7±0.8 (31)	2.6±0.6 (16)
Cambio absoluto estimado desde la situación basal al 12º mes (intervalo del confianza al 95%)	-0.6 (-0.9 to -0.4)	-0.7 (-1.1 to -0.5)

Datos expresados como media ± desviación estándar; los cambios estimados se expresan como promedios estimados con intervalo de confianza del 95% y se obtuvieron utilizando un

modelo de análisis de datos longitudinales restringido con ecuaciones de estimación generalizadas. **P no es significativo para ninguna de las comparaciones.**

Al año, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en términos de volúmenes ventriculares, FEVI o movimiento regional de la pared ventricular (tabla 5 y figura 6). Se constató un incremento similar desde el inicio en el volumen telediastólico del VI (10 vs 9 ml/m²) y en la FEVI (7.7% vs 8.6%) en AlloCSC-01 versus placebo, respectivamente. El volumen telesistólico del VI varió mínimamente desde el inicio (0,9 frente a -3,5 ml/m² en AlloCSC-01 versus placebo, respectivamente). La obstrucción microvascular estuvo igualmente presente en 17 pacientes en el grupo AlloCSC-01 (60% de los datos disponibles) y en 11 pacientes en el grupo de placebo (73% de los datos disponibles).

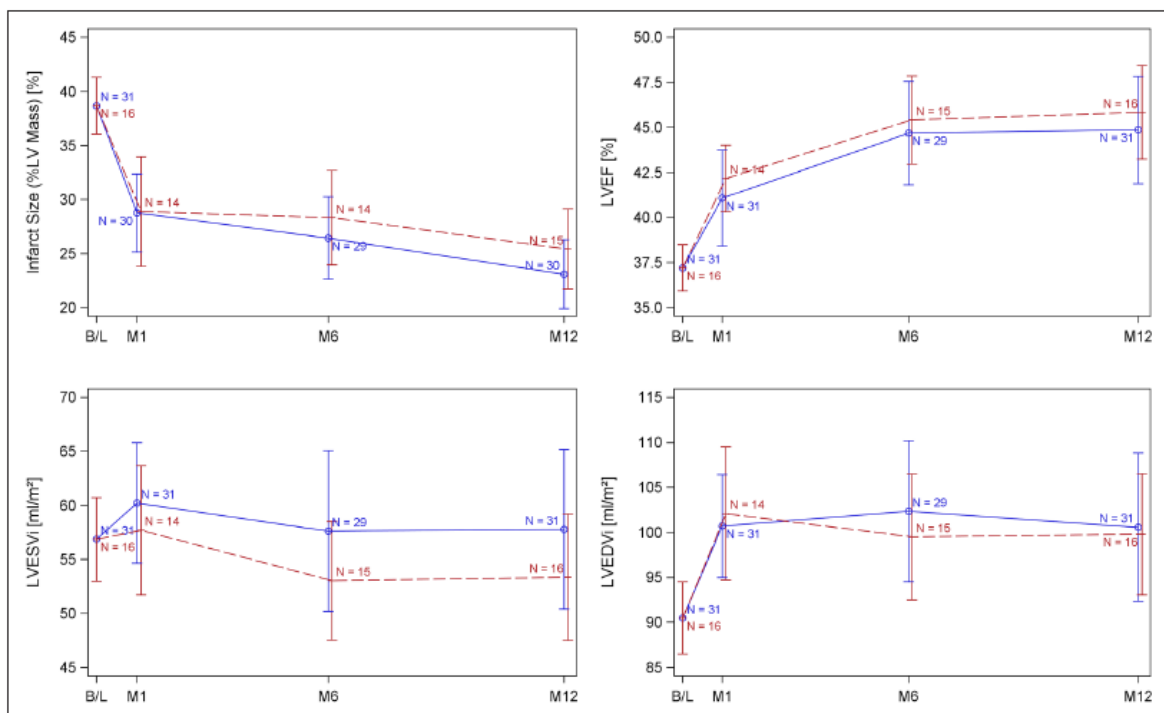


Figura 6. Evolución del tamaño del infarto (infarct size), la FEVI (LVEF), el volumen telesistólico del VI (LVESVI) y el volumen telediastólico del VI (LVEDVI) por RM al inicio, 1, 6

y 12 meses. Los resultados representan los promedios estimados con intervalos de confianza del 95% y se obtuvieron utilizando un modelo de análisis de datos longitudinales restringido utilizando ecuaciones de estimación generalizadas. M1 indica mes 1; M6, mes 6; y M12, mes 12.

Se realizaron análisis pre-especificados para evaluar las posibles interacciones entre el efecto del tratamiento sobre el cambio en el tamaño del infarto y covariables binarias (Figura 7). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los análisis de interacción binarios para la edad ≤ 55 años (valor mediano), una FEVI $\leq 37\%$ (valor mediano), un tamaño de infarto $\leq 39\%$ (valor mediano) o el donante. Los otros subgrupos pre-especificados no se incluyeron en el análisis debido al bajo número de eventos (<5).

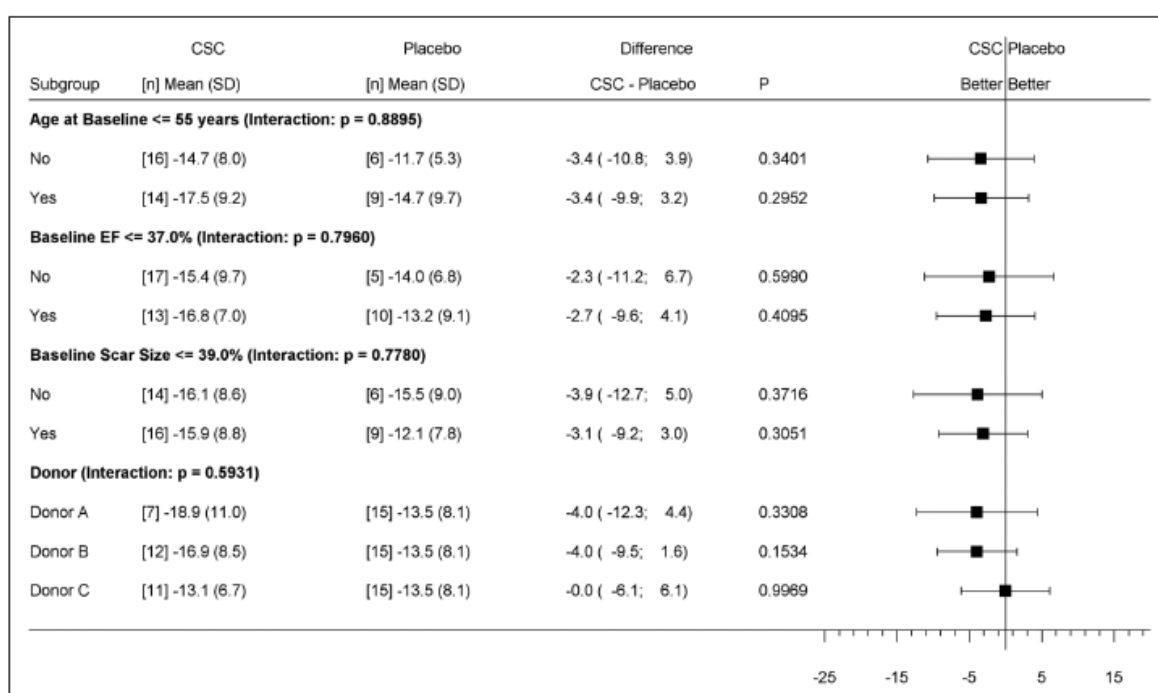


Figura 7. Análisis por subgrupos. Los valores mostrados corresponden a los cambios en el tamaño del infarto desde el inicio hasta el final del seguimiento entre los pacientes tratados con AlloCSC-01 o con placebo en los subgrupos preespecificados. Los valores medianos se utilizaron como puntos de corte para la edad, la FEVI y el tamaño del infarto. Los subgrupos con un número insuficiente de pacientes en cualquier categoría no se han incluido en el diagrama.

Los niveles basales de PCR fueron similares en ambos grupos (16.3 [11.6–31.5] mg/L vs 14.1 [9.5–21.8] mg/L en AlloCSC-01 *versus* placebo, respectivamente); sin embargo, al 7º día tras la administración del tratamiento, los niveles medios de PCR fueron significativamente más bajos en el grupo AlloCSC-01 (5.4 [3.0–15.0] mg/L) que en el grupo placebo (8.1 [3.3–35.5] mg/L; P = 0.04). Al mes, dichos niveles habían disminuido aún más en ambos grupos (2.0 [1.0–3.7] mg/L en el grupo AlloCSC-01 y 2.5 [1.0–4.0] mg/L en grupo placebo, con P=0.097 para la diferencia entre los grupos de tratamiento). Los niveles basales de NT-proBNP también fueron similares entre los grupos AlloCSC-01 (1101.0 [518.9–1413.0] ng/L) y placebo (737.0 [481.0–1618.0] ng/L), y no existieron diferencias significativas en cuanto a su variación desde el inicio hasta los 12 meses de seguimiento (–72.9 [–83 a –57.8] mg/L en AlloCSC-01 *versus* –74.1 [–82.9 a –52.4] mg/L en placebo, p = 0,9).

Tanto los pacientes tratados con AlloCSC-01 como los tratados con placebo mejoraron la clase funcional, con un aumento similar en los resultados del test de marcha de 6 minutos a los 12 meses (de 438 ± 128 a 555 ± 181 metros en el grupo AlloCSC-01 y de 407 ± 99 a 524 ± 100 metros en el grupo placebo, p = 0,6). No se observaron tampoco cambios significativos en la puntuación del cuestionario de calidad de vida con insuficiencia cardíaca de Minnesota entre ambos grupos a los 12 meses. Igualmente, la proporción de pacientes con clases I y II de la NYHA se mantuvo comparable entre ambos grupos a los 3, 6 y 12 meses, sin diferencias significativas en ningún momento.

IX. DISCUSIÓN

En este estudio, mostramos que las CSC alogénicas aisladas de biopsias de corazón humano, cultivadas y procesadas como AlloCSC-01 son seguras y bien toleradas cuando se administran por vía intracoronaria en la arteria responsable del infarto en pacientes con IAMCEST y moderado-alto riesgo de desarrollar IC. Sin embargo, con respecto a los objetivos exploratorios de eficacia, no observamos una reducción mediada por CSC en el tamaño del infarto ni una mejoría en el remodelado del VI a 1 año de seguimiento.

En la búsqueda de mejores estirpes celulares para la reparación miocárdica después de un IAMCEST, las CSC autólogas y las CDC se han investigado en ensayos clínicos piloto a pequeña escala con resultados de seguridad alentadores (108, 117). Sin embargo, los resultados de eficacia requieren ensayos clínicos a gran escala, y el enfoque autólogo impone restricciones importantes debido al gasto y la inflexibilidad relacionados con la extracción de tejido específico del paciente, la expansión celular y el control de calidad. Además, la eficacia de las células progenitoras y el potencial biológico de regeneración pueden variar con las comorbilidades del paciente (86, 223). Estas limitaciones han allanado el camino para explorar nuevos tratamientos de origen alogénico, que, a diferencia de los de origen autólogo, pueden estar disponibles en el mercado. Nuestro estudio fue el primero en administrar AlloCSC-01, proveniente de diferentes donantes pero con actividad biológica comparable, en fase temprana (5-7 días) después de un IAMCEST, en pacientes cuidadosamente seleccionados por su riesgo aumentado de desarrollar IC. Una evaluación precisa de la seguridad fue el principal objetivo del ensayo.

En una primera fase pre-especificada de escalado de dosis, comprobamos la seguridad de 3 dosis diferentes de AlloCSC-01; para, posteriormente, continuar con el ensayo clínico aleatorizado con una dosis objetivo definida de 35×10^6 CSC (215). Este estudio cumplió su objetivo principal al demostrar que AlloCSC-01 puede administrarse de manera segura en pacientes con IAMCEST: su infusión intracoronaria fue exitosa y no mostró problemas de seguridad clínicos, hemodinámicos ni arrítmicos, en comparación con placebo. Las enzimas cardíacas y la monitorización electrocardiográfica evidenciaron además que ni el procedimiento ni el producto celular causaban ningún daño adicional al miocardio; y un seguimiento clínico exhaustivo de todos los pacientes no reveló muertes o MACE en los 12 meses posteriores a la administración del tratamiento. Señalar aquí que la baja tasa de eventos en los pacientes tratados con placebo puede explicarse por el buen pronóstico a corto y medio plazo de nuestra población, que, aunque no fue seleccionada, resultó relativamente joven y con escasas comorbilidades, obteniendo por tanto mejores resultados que en series más grandes publicadas (224).

Se observaron algunos EA graves durante el desarrollo del estudio, pero sólo 2 se consideraron posiblemente relacionados con el tratamiento aplicado; ambos ocurrieron durante el primer mes, fueron breves y no requirieron terapia específica. Es importante destacar que el paciente que sufrió una dermatitis grave después de la infusión celular no estaba pre-sensibilizado a AlloCSC-01 y no desarrolló ningún anticuerpo específico del donante después de su administración. Teniendo en cuenta la naturaleza alogénica del producto estudiado en el ensayo CAREMI, es de particular relevancia que ningún paciente experimentó un EA relacionado con el sistema inmunitario en el seguimiento. De hecho,

únicamente desarrollaron anticuerpos específicos anti-AlloCSC-01 2 pacientes, concretamente contra el HLA-II y contra el locus C del complejo HLA-I. En estos 2 casos, la respuesta humoral no fue suficiente para dar como resultado una concentración duradera y clínicamente relevante de anticuerpos específicos de donante, es decir, que no se observaron eventos relacionados con hipersensibilidad. Por otro lado, es interesante el análisis exploratorio de marcadores inflamatorios que mostró una reducción significativamente mayor en los niveles de PCR a la semana y al mes después de la infusión de CSC, en comparación con placebo. Desafortunadamente, el bajo número de pacientes en nuestra población de estudio no permite extraer conclusiones definitivas sobre la relación entre la respuesta inmune y los resultados del ensayo; pero este hallazgo sí justifica el inicio de estudios más amplios y con seguimientos más prolongados, más teniendo en cuenta el beneficio recientemente establecido de los anticuerpos monoclonales anti-IL 1 β en pacientes con síndromes coronarios agudos (225). Finalmente, la baja inmunogenicidad de las células madre alogénicas evidenciada en el ensayo CAREMI está de acuerdo con los resultados, recientemente publicados, del análisis inmunológico del ensayo POSEIDON-DMC (226), en el cual se aplicaron células madre mesenquimales alogénicas en pacientes con miocardiopatía dilatada, y sin duda facilitará futuros ensayos a gran escala.

Diseñado como un ensayo clínico de factibilidad y seguridad de fase I-II, CAREMI tuvo poca potencia para revelar diferencias en eficacia según los objetivos subrogados basados en RM pre-especificados. Se seleccionó el tamaño del infarto como el principal objetivo secundario de eficacia exploratoria debido a su fuerte asociación con la mortalidad por

todas las causas y la hospitalización por IC (227), encontrándose que el tratamiento con AlloCSC-01 tuvo un efecto mínimo sobre la variación en el tamaño del infarto, y no influyó en los volúmenes del VI ni en la FEVI. La RM está sobradamente aceptada como el *gold standard* para la obtención de imágenes cardíacas en el contexto de disfunción ventricular en el IAMCEST y se ha utilizado ampliamente para evaluar objetivos subrogados de eficacia en ensayos de terapia celular, lo que permite diseñar éstos con poblaciones más pequeñas y tiempos de seguimiento más cortos (228). Nuestros resultados se hallan en consonancia con los de otros ensayos con células madre en el IAMCEST (53, 153, 229, 230) y con los de metanálisis en este contexto (57, 231-234). Una posible explicación de la falta de beneficio adicional de AlloCSC-01 en los objetivos subrogados basados en RM puede relacionarse con la dosis o el momento de la administración:

- ✓ La dosis de AlloCSC-01 utilizada puede no ser suficiente para contrarrestar los cambios moleculares, celulares y tisulares que tienen lugar en el miocardio durante las primeras semanas después de un IAMCEST y que activan el complejo proceso de remodelado. Sin embargo, la dosis máxima administrada fue la permitida por las autoridades competentes y la Agencia Europea del Medicamento.
- ✓ Escogimos la ventana de tiempo en base a ensayos preclínicos en modelos porcinos que indicaban, por un lado, altas tasas de mortalidad al inyectar las células justo después de la reperusión y, por otro lado, buenas tasas de retención de CSC cuando éstas eran inyectadas de 5 a 7 días después del IAM.

Alternativamente, los excelentes resultados de las actuales estrategias de reperfusión percutánea, agresivas y rápidas, así como de la reciente farmacoterapia estandarizada en pacientes con IAMCEST han reducido notablemente la oportunidad de beneficio añadido por parte de cualquier intervención terapéutica novedosa (2). Efectivamente, consistente con el éxito de la atención contemporánea al IAMCEST, observamos una gran reducción en el tamaño del infarto en nuestra población de control y una ausencia virtual de remodelado adverso del VI a 1 año (estudios recientes han definido el remodelado adverso del VI clínicamente relevante como un aumento de > 20% en el volumen telediastólico (235), siendo éste más del doble del observado en nuestros pacientes del grupo control).

X. LIMITACIONES Y FORTALEZAS

El pequeño tamaño de la muestra y el diseño del ensayo no permitieron una evaluación significativa de la eficacia. Es posible que el seguimiento a 1 año no haya sido lo suficientemente largo como para apreciar los eventos clínicos, la dosis de células infundidas no haya sido lo suficientemente alta como para detectar un beneficio potencial en los parámetros basados en la RM, o el marco temporal idóneo para la infusión de AlloCSC-01 en el contexto de un IAMCEST no haya estado lo suficientemente predefinido mediante estudios específicos en humanos.

Sin embargo, la principal ventaja de nuestro estudio radica en el exhaustivo seguimiento, tanto clínico como inmunológico, llevado a cabo para demostrar holgadamente la seguridad de este tratamiento alogénico. Además, se ha comprobado la bioequivalencia de productos biológicos provenientes de diferentes donantes, lo cual facilita también la comercialización del tratamiento. Por ambos motivos, los estudios fase III a gran escala, con una población de pacientes mejor seleccionados en base a una estratificación de riesgo de IC más rigurosa y con objetivos primarios clínicamente relevantes (como mortalidad, descompensación de IC, reinfarto, necesidad de implante de dispositivos...), resultan ahora más accesibles, para evaluar de forma definitiva la eficacia del tratamiento.

XI. NUESTRAS PRINCIPALES APORTACIONES Y VÍAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

En primer lugar, hemos dado un paso importante en la búsqueda de productos celulares para la medicina regenerativa cardíaca: hemos confirmado ampliamente la seguridad tanto de las CSC alogénicas como de su administración intracoronaria en fases tempranas del IAMCEST. Además, al tratarse de un producto alogénico, reproducible a gran escala, y por tanto comercializable, hace más accesibles los ensayos clínicos de fase II-III, con muestras poblacionales y seguimientos más extensos, necesarios para confirmar y/o rechazar la eficacia del tratamiento.

En segundo lugar, hemos evidenciado el buen pronóstico a corto y medio plazo de los pacientes con IAMCEST, en ausencia de otras comorbilidades relevantes, gracias al arsenal terapéutico actual. Desde el punto de vista de la investigación en terapia celular, este hecho nos obliga a redirigir nuestra población diana hacia pacientes más deteriorados clínica o funcionalmente desde el punto de vista cardiovascular, y por tanto, con más beneficio potencial de la reparación miocárdica (228).

No obstante, quedan multitud de puertas abiertas a futuras investigaciones de fase I y II principalmente en cuanto a los mecanismos de acción subyacentes, la utilidad de dosis celulares mayores, la conveniencia de administraciones repetidas (236), el potencial beneficio de diferentes estirpes celulares combinadas (237) o el momento óptimo de aplicación del tratamiento. Y, en cuanto a la progresión a ensayos clínicos fase III, sería

interesante homogeneizar protocolos clínicos entre diferentes centros, seleccionar poblaciones con peor pronóstico, estandarizar y optimizar la interpretación de objetivos subrogados de imagen e introducir objetivos sólidos de morbi-mortalidad.

Con la intención de avanzar con estas líneas de investigación, surgió el consorcio TACTICS como la primera red de investigación cooperativa mundial en el campo de la medicina regenerativa cardiaca. El documento de consenso publicado por este grupo en 2017 (223) describe las prioridades y los desafíos en el campo de la investigación básica y traslacional, práctica clínica, vías regulatorias y estrategias de financiación para la próxima década, así como proporciona recomendaciones basadas en la evidencia para guiar la aplicación futura de productos regenerativos en la lucha contra la enfermedad cardiovascular. Los objetivos principales de este grupo se pueden resumir en la siguiente lista:

1. Fomentar el conocimiento acerca del complejo mecanismo molecular, celular y tisular que gobierna la homeostasis regenerativa y el proceso de reparación cardiovascular.
2. Estandarizar modelos animales, pequeños y grandes, para la investigación cardiovascular que nos acerquen a la investigación clínica.
3. Colaborar en la consecución de ensayos clínicos multicéntricos de fase III a gran escala para demostrar la eficacia clínica de las terapias regenerativas.
4. Normalizar los requisitos reglamentarios internacionales para garantizar la adopción de las terapias aprobadas.

En conclusión, esta cooperación multidisciplinaria e internacional nos brinda la oportunidad de optimizar el arsenal terapéutico y de hacer un progreso real en medicina regenerativa cardíaca. Al aunar los esfuerzos de los principales grupos de expertos, podremos desarrollar colectivamente tratamientos efectivos que mejorarán el pronóstico de los pacientes con enfermedades cardiovasculares.

XII. CONCLUSIONES

El ensayo CAREMI contribuye a la creciente evidencia clínica que respalda la factibilidad y la seguridad de la terapia celular, concretamente, de la infusión intracoronaria de CSC en la fase aguda del IAMCEST. No se observaron eventos cardíacos o inmunológicos clínicamente significativos después de la infusión de células alogénicas ni durante el seguimiento. Sin embargo, nuestro estudio no demostró ningún beneficio incremental aportado por el tratamiento con CSC en la reducción del tamaño del infarto, los índices de remodelado del VI o la clase funcional frente a los pacientes tratados con placebo. Serían necesarios estudios con poder estadístico adecuado, poblaciones más grandes y con mayor riesgo de remodelado adverso si alguna vez pretendemos demostrar la eficacia potencial de AlloCSC-01 en los parámetros estructurales y su resultado clínico en el IAMCEST.

Las terapias regenerativas representan un nuevo paradigma en la medicina cardiovascular que ha ido creciendo en los últimos años. La traducción de la investigación básica y los estudios en animales al escenario clínico nunca ha sido tan rápida, impulsada por el enorme entusiasmo generado por la posibilidad de lograr la regeneración del corazón. Esta euforia inicial ha sido amortiguada por algunos resultados contradictorios y por los beneficios modestos observados en la función cardíaca, lo que lleva al escepticismo en una parte de la comunidad científica. Pero estos resultados pioneros no deben interpretarse como la evidencia definitiva a favor o en contra de estas terapias. En su lugar, han establecido su seguridad y han demostrado las fuertes barreras que deben

superarse, proporcionando información importante sobre el origen de las células que se utilizarán, así como sobre los procesos de fabricación y las vías de administración. La combinación de investigación básica celular, molecular y genética con estudios preclínicos y ensayos clínicos bien diseñados, junto con redes de investigación más colaborativas y con la ayuda definitiva de la bioingeniería, serán las claves para el desarrollo definitivo de la medicina regenerativa cardíaca. Teniendo todo esto en cuenta, el futuro de la terapia celular es más prometedor que nunca, y el objetivo de una verdadera reparación del miocardio dañado permanece para los próximos años.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Go AS MD, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
2. Puymirat E ST, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P, Lemesle G, Motreff P, Popovic B, Khalife K, Labèque JN, Perret T, Le Ray C, Orion L, Jouve B, Blanchard D, Peycher P, Silvain J, Steg PG, Goldstein P, Guéret P, Belle L, Aissaoui N, Ferrières J, Schiele F, Danchin N. Acute myocardial infarction: changes in patient characteristics, management, and 6-month outcomes over a period of 20 years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation*. 2017;136(20):1908-19.
3. Benjamin EJ VS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Lutsey PL, Mackey JS, Matchar DB, Matsushita K, Mussolino ME, Nasir K, O'Flaherty M, Palaniappan LP, Pandey A, Pandey DK, Reeves MJ, Ritchey MD, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sampson UKA, Satou GM, Shah SH, Spartano NL, Tirschwell DL, Tsao CW, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2018.Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(12):e67-e492.
4. McMurray JJ AS, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(8):803-69.
5. JJ M. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med*. 2010;362(3):228-38.
6. Stewart S MK, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001;3(3):315-22.
7. Beltrami AP UK, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1750-7.
8. Poss KD WL, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002;298(5601):2188-90.

9. Hsieh PC SV, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* 2007;13(8):970-4.
10. Sanz-Ruiz R GIE, Arranz AV, Fernández Santos ME, Fernández PL, Fernández-Avilés F. Phases I-III clinical trials using adult stem cells. *Stem Cells Int.* 2010;2010:579142-54.
11. Chien KR DI, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science.* 2008;322(5907):1494-7.
12. Ciecierska A CK, Motyl T, Sadkowski T. Myogenic cells applications in regeneration of post-infarction cardiac tissue. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(4):401-8.
13. Farahmand P LT, Weisel RD, Fazel S, Yau T, Menasche P, Li RK. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. *Circulation.* 2008;118(14 Suppl):S130-S7.
14. Gavira JJ P-IM, Abizanda G, García-Rodríguez A, Orbe J, Páramo JA, Belzunce M, Rábago G, Barba J, Herreros J, Panizo A, de Jalón JA, Martínez-Caro D, Prósper F. A comparison between percutaneous and surgical transplantation of autologous skeletal myoblasts in a swine model of chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):744-53.
15. Taylor DA AB, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998;4(8):929-33.
16. Dib N MP, Campbell A, Yeager M, Pagani FD, Wright S, MacLellan WR, Fonarow G, Eisen HJ, Michler RE, Binkley P, Buchele D, Korn R, Ghazoul M, Dinsmore J, Opie SR, Diethrich E. Feasibility and safety of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy. *Cell Transplant.* 2005;14(1):11-9.
17. Hagege AA MJ, Vilquin JT, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasché P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl): I108-I13.
18. Menasché P HA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(7):1078-83.
19. Menasché P HA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001;357(9252):279-80.
20. Siminiak T KR, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzeźniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J.* 2004;148(3):531-7.
21. Menasché P AO, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008;117(9):1189-200.
22. Reinecke H PV, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(2):241-9.
23. Fernandes S AJ, Lande G, Nguyen JM, Forest V, Bignolais O, Lamirault G, Heudes D, Orsonneau JL, Heymann MF, Charpentier F, Lemarchand P. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2006;69(2):348-58.
24. Abraham MR HC, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T, Li RA, O' Rourke B, Marbán E. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res.* 2005;97(2):159-67.

25. Fernandes S vRH, Forest V, Evain S, Leblond AL, Mérot J, Charpentier F, de Bakker JM, Lemarchand P. Cardiac cell therapy: overexpression of connexin43 in skeletal myoblasts and prevention of ventricular arrhythmias. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3703-12.
26. Roell W LT, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von Maltzahn J, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents postinfarct arrhythmia. *Nature*. 2007;450(7171):819-24.
27. Maurel A AK, Sabbah L, Vignier N, Le Lorc'h M, Mandet C, Bissery A, Garcin I, Carrion C, Fiszman M, Bruneval P, Hagege A, Carpentier A, Vilquin JT, Menasché P. Can cold or heat shock improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium? *Transplantation*. 2005;80(5):660-5.
28. Rissanen TT KP, Markkanen JE, Liimatainen T, Ordén MR, Kholová I, de Goede A, Heikura T, Gröhn OH, Ylä-Herttuala S. Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterialization and sprouting angiogenesis. *Circulation*. 2005;112(25):3937-46.
29. Rissanen TT MJ, Arve K, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhiainen S, Cashion L, Gruchala M, Närvänen O, Taipale P, Kauppinen RA, Rubanyi GM, Ylä-Herttuala S. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J*. 2003;17(1):100-2.
30. Yau TM LG, Weisel RD, Reheman A, Jia ZQ, Mickle DA, Li RK. Vascular endothelial growth factor transgene expression in cell-transplanted hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(4):1180-7.
31. Zimna A JA, Rozwadowska N, Fraczek M, Kucharzewska P, Rucinski M, Mietkiewski T, Kurpisz M. Biological properties of human skeletal myoblasts genetically modified to simultaneously overexpress the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor-4. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(2):193-207.
32. Nakamura Y AY, Piras BA, Hirai H, Tastad CT, Verma M, Christ AJ, Zhang J, Yamazaki T, Yoshiyama M, Asakura A. Increased angiogenesis and improved left ventricular function after transplantation of myoblasts lacking the MyoD gene into infarcted myocardium. *PLoS One*. 2012;7(7):e41736.
33. Hirai H VM, Watanabe S, Tastad C, Asakura Y, Asakura A. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. *J Cell Biol*. 2010;191(2):347-65.
34. Orlic D KJ, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-5.
35. Behfar A C-DR, Terzic A, Gersh BJ. Cell therapy for cardiac repair-lessons from clinical trials. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(4):232-46.
36. Dimmeler S ZA, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005;115(3): 572-83.
37. Segers VF LR. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451(7181):937-42.
38. Assmus B HJ, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12): 1222-32.
39. Assmus B SV, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24): 3009-17.
40. Fernández-Avilés F SRJ, García-Frade J, Fernández ME, Peñarrubia MJ, de la Fuente L, Gómez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernández J, Gutierrez O, Sánchez PL, Hernández C,

Sanz R, García-Sancho J, Sánchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004;95(7): 742-8.

41. Schächinger V ES, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1210-21.

42. Stamm C WB, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361(9351):45-6.

43. Strauer BE BM, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106(15):1913-8.

44. Wollert KC MG, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364(9429):141-8.

45. Grajek S PM, Gil L, Breborowicz P, Lesiak M, Czepczyński R, Sawiński K, Straburzyńska-Migaj E, Araszkiewicz A, Czyz A, Kozłowska-Skrzypczak M, Komarnicki M. Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: Impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. *Eur Heart J*. 2010;31(6):691-702.

46. Janssens S DC, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: doubleblind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9505):113-21.

47. Lunde K SS, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1199-209.

48. Meyer GP WK, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006;113(10):1287-94.

49. Penicka M HJ, Kobylka P, Pytlik R, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, Skalicka H, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrowderived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(24):2373-4.

50. Perin EC WJ, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA*. 2012;307(16):1717-26.

51. Sürder D MR, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, Turchetto L, Radrizzani M, Astori G, Schwitter J, Erne P, Zuber M, Auf der Maur C, Jamshidi P, Gaemperli O,

Windecker S, Moschovitis A, Wahl A, Bühler I, Wyss C, Kozerke S, Landmesser U, Lüscher TF, Corti R. Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function. *Circulation*. 2013;127(19):1968-79.

52. Traverse JH HT, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Forder JR, Byrne BJ, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Baran KW, Chambers J, Lambert C, Raveendran G, Simon DI, Vaughan DE, Simpson LM, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Silva GV, Jorgenson BC, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Smith DX, Baraniuk S, Piller LB, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA*. 2011;306(19):2110-9.

53. Traverse JH HT, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, Forder JR, Anderson RD, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Chambers J, Baran KW, Raveendran G, Lambert C, Lerman A, Simon DI, Vaughan DE, Lai D, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Kappenman C, Westbrook L, Piller LB, Simpson LM, Baraniuk S, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Spoon DB, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2380-9.

54. Traverse JH MD, Harvey K, Jorgenson BC, Olson RE, Bostrom N, Kadidlo D, Lesser JR, Jagadeesan V, Garberich R, Henry TD. Results of a phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bone marrow mononuclear stem cell administration in patients following ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J*. 2010;160(3):428-34.

55. Wöhrle J MN, Mailänder V, Nusser T, Schauwecker P, von Scheidt F, Schwarz K, Bommer M, Wiesneth M, Schrezenmeier H, Hombach V. Results of intracoronary stem cell therapy after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2010;105(6):804-12.

56. Abdel-Latif A BR, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007;167(10):989-97.

57. Delewi R HA, Tijssen JG, Schächinger V, Wojakowski W, Roncalli J, Aakhus S, Erbs S, Assmus B, Tendera M, Goekmen Turan R, Corti R, Henry T, Lemarchand P, Lunde K, Cao F, Huikuri HV, Sürder D, Simari RD, Janssens S, Wollert KC, Plewka M, Grajek S, Traverse JH, Zijlstra F, Piek JJ. Impact of intracoronary bone marrow cell therapy on left ventricular function in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction: a collaborative meta-analysis. *Eur Heart J*. 2014;35(15):989-98.

58. Jeevanantham V BM, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2012;126(5):551-68.

59. Martin-Rendon E BS, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J*. 2008;29(15):1807-18.

60. Zimmet H PP, Porapakkhram P, Sata Y, Haas SJ, Itescu S, Forbes A, Krum H. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(1):91-105.

61. Laflamme MA MC. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*. 2005;23(7):845-56.

62. Murry CE SM, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JL, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. «» , : 428: . Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428(6983):664-8.

63. Balsam LB, WA, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428(6983):668-73.
64. Stolzinger A, JE, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(3):163-73.
65. Dimmeler S, LA. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res*. 2008;102(11):1319-30.
66. Heinrich EM, DS. MicroRNAs and stem cells: control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circ Res*. 2012;110(7):1014-22.
67. Leonardo TR, SH, Loring JF, Laurent LC. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1114-21.
68. Xu Q, SF, Castillo J, Iekushi K, Boon RA, Farcas R, Manavski Y, Li YG, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Micro- RNA-34a contributes to the impaired function of bone marrow-derived mononuclear cells from patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(23):2107-17.
69. Iekushi K, SF, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Regulation of cardiac microRNAs by bone marrow mononuclear cell therapy in myocardial infarction. *Circulation*. 2012;125(14):1765-73.
70. Mathur A, AR, Assmus B, Bartunek J, Belmans A, Bönig H, Crea F, Dimmeler S, Dowlut S, Fernández-Avilés F, Galiñanes M, Garcia-Dorado D, Hartikainen J, Hill J, Hogardt-Noll A, Homsy C, Janssens S, Kala P, Kastrup J, Martin J, Menasche P, Miklik R, Mozid A, San Román JA, Sanz-Ruiz R, Tendera M, Wojakowski W, Ylä-Herttuala S, Zeiher A. The effect of intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells on all-cause mortality in acute myocardial infarction: rationale and design of the BAMI trial. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(11):1545-50.
71. Friedenstein AJ, CR, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
72. Schuleri KH, BA, Hare JM. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol*. 2007(180):195-218.
73. Pittenger MF, MA, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
74. Phinney DG, PD. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902.
75. Makino S, FK, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
76. Toma C, PM, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
77. Quevedo HC, HK, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW, Hare JM. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(33):14022-7.
78. Schuleri KH, FG, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte JV, McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2009;30(22):2722-32.
79. Shake JG, GP, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(6):1919-25; discussion 26.

80. Katritsis DG SP, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Voridis EM, Papamichail M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005;65(3):321-9.
81. Williams AR TB, Velazquez DL, McNiece I, Altman P, Rouy D, Mendizabal AM, Pattany PM, Lopera GA, Fishman J, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res.* 2011;108(7):792-6.
82. Heldman AW DD, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, Mushtaq M, Williams AR, SuncionVY, McNiece IK, Gherlin E, Soto V, Lopera G, Miki R, WillensH, Hendel R, Mitrani R, Pattany P, Feigenbaum G, Oskoue B, Byrnes J, Lowery MH, Sierra J, Pujol MV, Delgado C, Gonzalez PJ, Rodriguez JE, Bagno LL, Rouy D, Altman P, Foo CW, da Silva J, Anderson E, Schwarz R, Mendizabal A, Hare JM. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA.* 2014;311(1):62-73.
83. Psaltis PJ ZA, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells.* 2008;26(9):2201-10.
84. Behfar A TA. Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem cells yields cardiac progeny. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3(Suppl 1):S78-82.
85. Behfar A FR, Arrell DK, Dzeja PP, Perez-Terzic C, Terzic Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Guided stem cell cardiopoiesis: discovery and translation. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(4):523-9.
86. Behfar A YS, Crespo-Diaz R, Nesbitt JJ, Rowe LA, Perez-Terzic C, Gaussin V, Homsy C, Bartunek J, Terzic A. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(9):721-34.
87. Hahn JY CH, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, Chung JH, Bae JW, Oh BH, Park YB, Kim HS. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(9):933-43.
88. Bartunek J BA, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineagespecified biologics. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(23):2329-38.
89. Bartunek J TA, Davison BA, Filippatos GS, Radovanovic S, Beleslin B, Merkely B, Musialek P, Wojakowski W, Andreka P, Horvath IG, Katz A, Dolatabadi D, El Nakadi B, Arandjelovic A, Edes I, Seferovic PM, Obradovic S, Vanderheyden M, Jagic N, Petrov I, Atar S, Halabi M, Gelev VL, Shochat MK, Kasprzak JD, Sanz-Ruiz R, Heyndrickx GR, Nyolczas N, Legrand V, Guédès A, Heyse A, Moccetti T, Fernandez-Aviles F, Jimenez-Quevedo P, Bayes-Genis A, Hernandez-Garcia JM, Ribichini F, Gruchala M, Waldman SA, Teerlink JR, Gersh BJ, Povsic TJ, Henry TD, Metra M, Hajjar RJ, Tendera M, Behfar A, Alexandre B, Seron A, Stough WG, Sherman W, Cotter G, Wijns W. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischaemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J.* 2017;38(9):648-60.
90. Bartunek J DB, Sherman W, Povsic T, Henry TD, Gersh B, Metra M, Filippatos G, Hajjar R, Behfar A, Homsy C, Cotter G, Wijns W, Tendera M, Terzic A. Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) trial design. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(2):160-8.
91. McGinley LM MJ, Stocca A, Duffy A, Flynn A, O'Toole D, O'Brien T. Mesenchymal stem cell survival in the infarcted heart is enhanced by lentivirus vector-mediated heat shock protein 27 expression. *Hum Gene Ther.* 2013;24(10):840-51.

92. Huang F LM, Fang ZF, Hu XQ, Liu QM, Liu ZJ, Tang L, Zhao YS, Zhou SH. Overexpression of MicroRNA-1 improves the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation after myocardial infarction. *Cardiology*. 2013;125(1):18-30.
93. Wang L PZ, Wang S, Li N, Feng Y, Lu G, Millard RW, Ashraf M. Protein kinase G1 α overexpression increases stem cell survival and cardiac function after myocardial infarction. *PLoS One*. 2013;8(3):e60087.
94. Ye L ZP, Duval S, Su L, Xiong Q, Zhang J. Thymosin β 4 increases the potency of transplanted mesenchymal stem cells for myocardial repair. *Circulation*. 2013;128(11 Suppl 1):S32-S41.
95. Beltrami AP BL, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
96. Bergmann O BR, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324(5923):98-102.
97. Nadal-Ginard B EG, Torella D. The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res*. 2014;13(3 Pt B):615-30.
98. Angert D BR, Kubo H, Zhang H, Chen X, Wang W, Ogorek B, Barbe M, Houser SR. Repair of the injured adult heart involves new myocytes potentially derived from resident cardiac stem cells. *Circ Res*. 2011;108(10):1226-37.
99. Ellison GM TD, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(Suppl 1):S52-S9.
100. Ellison GM WC, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*. 2012;98(1):5-10.
101. Ellison GM VC, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, Henning BJ, Stirparo GG, Papait R, Scarfò M, Agosti V, Viglietto G, Condorelli G, Indolfi C, Ottolenghi S, Torella D, Nadal-Ginard B. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*. 2013;154(4):827-42.
102. Van Berlo JH KO, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC, Middleton RC, Marbán E, Molkentin JD. c-kit⁺ cells minimally contribute to cardiomyocytes in the heart. *Nature*. 2014;509(7500):337-41.
103. Bolli R TX, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128(2):122-31.
104. Dawn B SA, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P, Bolli R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(10):3766-71.
105. Linke A MP, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Böhm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(25):8966-71.
106. Rota M P-IM, Misao Y, De Angelis A, Maestroni S, Ferreira-Martins J, Fiumana E, Rastaldo R, Arcarese ML, Mitchell TS, Boni A, Bolli R, Urbanek K, Hosoda T, Anversa P, Leri A, Kajstura J. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res*. 2008;103(1):107-16.
107. Tang XL RG, Sanganalmath SK, Yuan F, Sato H, Mu J, Dai S, Li C, Chen N, Peng Y, Dawn B, Hunt G, Leri A, Kajstura J, Tiwari S, Shirk G, Anversa P, Bolli R. Intracoronary

administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*. 2010;121(2):293-305.

108. Bolli R CA, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847-57.

109. Chugh AR BG, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatrooles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S54-64.

110. Messina E DAL, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95(9):911-21.

111. Smith RR BL, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.

112. Bearzi C RM, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(35):14068-73.

113. Oh H BS, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(21):12313-8.

114. Johnston PV ST, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Lai S, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120(12):1075-83.

115. Lee ST WA, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, Li TS, Terrovitis J, Yee K, Simsir S, Makkar R, Marbán E. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure postmyocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(4):455-65.

116. Li TS CK, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, Matsushita N, Blusztajn A, Terrovitis J, Kusuoka H, Marbán L, Marbán E. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(10):942-53.

117. Makkar RR SR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379(9819):895-904.

118. Malliaras K MR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, Marbán L, Mendizabal A, Cingolani E, Johnston PV, Gerstenblith G, Schuleri KH, Lardo AC, Marbán E. Intracoronary cardiospherederived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(2):110-22.

119. Hong KU GY, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, Du J, Book MJ, Zhu X, Nong Y, Bhatnagar A, Bolli R. c-kit⁺ Cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and negligible retention in the recipient heart. *PLoS One*. 2014;9(5):e96725.

120. Chimenti I SR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010;106(5):971-80.
121. Mohsin S KM, Toko H, Bailey B, Cottage CT, Wallach K, Nag D, Lee A, Siddiqi S, Lan F, Fischer KM, Gude N, Quijada P, Avitabile D, Truffa S, Collins B, Dembitsky W, Wu JC, Sussman Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Human cardiac progenitor cells engineered with Pim-I kinase enhance myocardial repair. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(14):1278-87.
122. Cottage CT NL, Sundararaman B, Din S, Joyo AY, Bailey B, Gude N, Hariharan N, Sussman MA. Increased mitotic rate coincident with transient telomere lengthening resulting from pim-1 overexpression in cardiac progenitor cells. *Stem Cells*. 2012;30(11):2512-22.
123. Cai C TL, Vu D, He JQ, Guo Y, Li Q, Tang XL, Rokosh G, Bhatnagar A, Bolli R. The heme oxygenase 1 inducer (CoPP) protects human cardiac stem cells against apoptosis through activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK)/NRF2 signaling pathway and cytokine release. *J Biol Chem*. 2012;287(40):33720-32.
124. Zafir A RR, Long BW, McCracken J, Aird A, Alvarez A, Cummins TD, Li Q, Hill BG, Bhatnagar A, Prabhu SD, Bolli R, Jones SP. Protein O-GlcNAcylation is a novel cytoprotective signal in cardiac stem cells. *Stem Cells*. 2013;31(4):765-75.
125. Pendergrass KD BA, Seshadri G, Maiellaro-Rafferty K, Che PL, Brown ME, Davis ME. Acute preconditioning of cardiac progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury. *Stem Cells Dev*. 2013;22(17):2414-24.
126. Takehara N TY, Tateishi K, Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, Takahashi T, Takamatsu T, Fukushima M, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(23):1858-65.
127. Hatzistergos KE QH, Oskoue BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107(7):913-22.
128. Williams AR HK, Addicott B, McCall F, Carvalho D, Suncion V, Morales AR, Da Silva J, Sussman MA, Heldman AW, Hare JM. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*. 2013;127(2):213-23.
129. Le Blanc K TC, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890-6.
130. Batten P SP, Antoniow JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, Yacoub MH. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2263-73.
131. Chiesa S MS, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, Frassoni F, Bartolomé ST, Sambuceti G, Traggiai E, Uccelli A. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(42):17384-9.
132. Li W RG, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Yau TM, Fung K, Weisel RD, Fujii T, Mickle DA, Li RK. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*. 2012;19(9):1505-13.
133. Huang XP SZ, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, Li RK. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*. 2010;122(23):2419-29.

134. Mirotsoy M JT, Schmeckpeper J, Gneccchi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(2):280-9.
135. Amado LC SA, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(32):11474-9.
136. Dai W HS, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation.* 2005;112(2):214-23.
137. Williams AR SV, McCall F, Guerra D, Mather J, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Durable scar size reduction due to allogeneic mesenchymal stem cell therapy regulates wholechamber remodeling. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(3):e000140.
138. Zhao Y LT, Wei X, Bianchi G, Hu J, Sanchez PG, Xu K, Zhang P, Pittenger MF, Wu ZJ, Griffith BP. Mesenchymal stem cell transplantation improves regional cardiac remodeling following ovine infarction. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(9):685-95.
139. Hare JM TJ, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(24):2277-86.
140. Hare JM FJ, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Gherlin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA.* 2012;308(22):2369-79.
141. Hamamoto H GJ, Ryan LP, Hinmon R, Martens TP, Schuster MD, Plappert T, Kiupel M, St John-Sutton MG, Itescu S, Gorman RC. Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg.* 2009;87(3):794-801.
142. Gronthos S FS, Diamond P, Simmons PJ, Itescu S, Zannettino AC. A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16(6):953-63.
143. Psaltis PJ PS, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, Worthley SG, Gronthos S, Zannettino AC. Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *J Cell Physiol.* 2010;223(2):530-40.
144. See F ST, Psaltis PJ, Sondermeijer HP, Gronthos S, Zannettino AC, Govaert KM, Schuster MD, Kurlansky PA, Kelly DJ, Krum H, Itescu S. Therapeutic effects of human STRO-3-selected mesenchymal precursor cells and their soluble factors in experimental myocardial ischemia. *J Cell Mol Med.* 2011;15(10):2117-29.
145. Dixon JA GR, Stroud RE, Bouges S, Hirotsugu H, Gorman JH, Martens TP, Itescu S, Schuster MD, Plappert T, St John-Sutton MG, Spinale FG. Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction. *Circulation.* 2009;120(11 Suppl):S220-S9.
146. Houtgraaf JH dJR, Kazemi K, de Groot D, van der Spoel TI, Arslan F, Hoefer I, Pasterkamp G, Itescu S, Zijlstra F, Geleijnse ML, Serruys PW, Duckers HJ. Intracoronary infusion of allogeneic mesenchymal precursor cells directly after experimental acute myocardial infarction reduces infarct size, abrogates adverse remodeling, and improves cardiac function. *Circ Res.* 2013;113(2):153-66.

147. Penn MS ES, Gandhi S, Greenbaum A, Hodes Z, Mendelsohn FO, Strasser D, Ting AE, Sherman W. Adventitial delivery of an allogeneic bone marrow-derived adherent stem cell in acute myocardial infarction: phase I clinical study. *Circ Res.* 2012;110(2):304-11.
148. Malliaras K LT, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, Galang G, Zhang Y, Schoenhoff F, Van Eyk J, Marbán L, Marbán E. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation.* 2012;125(1):100-12.
149. Tseliou E PS, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, Marbán L, Luthringer D, Marbán E. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(10):1108-19.
150. Malliaras K SR, Kanazawa H, Yee K, Seinfeld J, Tseliou E, Dawkins JF, Kreke M, Cheng K, Luthringer D, Ho CS, Blusztajn A, Valle I, Chowdhury S, Makkar RR, Dharmakumar R, Li D, Marbán L, Marbán E. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation.* 2013;128(25):2764-75.
151. Yee K MK, Kanazawa H, Tseliou E, Cheng K, Luthringer DJ, Ho CS, Takayama K, Minamino N, Dawkins JF, Chowdhury S, Duong DT, Seinfeld J, Middleton RC, Dharmakumar R, Li D, Marbán L, Makkar RR, Marbán E. Allogeneic cardiospheres delivered via percutaneous transendocardial injection increase viable myocardium, decrease scar size, and attenuate cardiac dilatation in porcine ischemic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2014;9(12):e113805.
152. Chakravarty T MR, Ascheim DD, Traverse JH, Schatz R, DeMaria A, Francis GS, Povsic TJ, Smith RR, Lima JA, Pogoda JM, Marbán L, Henry TD. ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design. *Cell Transplant.* 2017;26(2):205-14.
153. TD H. ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial Results. . Paper presented at: The American Heart Association Annual Scientific Sessions (AHA 2017). 2017;Anaheim, CA.
154. Ménard C HA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Pucéat M, Menasché P. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet.* 2005;366(9490):1005-12.
155. Caspi O HI, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, Yankelson L, Aronson D, Beyar R, Gepstein L. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(19):1884-93.
156. Takahashi K YS. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
157. Riggs JW BB, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev.* 2013;22(1):37-50.
158. Sanz-Ruiz R SM, Muñoz MD, Martín IL, Parma R, Fernández PL, Fernández-Avilés F. Adipose tissue-derived stem cells: the friendly side of a classic cardiovascular foe. *J Cardiovasc Transl Res.* 2008;1(1):55-63.
159. Sánchez PL S-RR, Fernández-Santos ME, Fernández-Avilés F. Cultured and freshly isolated adipose tissue-derived cells: fat years for cardiac stem cell therapy. *Eur Heart J.* 2010;31(4):394-7.
160. Wang L DJ, Tian W, Xiang B, Yang T, Li G, Wang J, Gruwel M, Kashour T, Rendell J, Glogowski M, Tomanek B, Freed D, Deslauriers R, Arora RC, Tian G. Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(3):H1020-H31.
161. Valina C PK, Song YH, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, Le Jemtel TH, Alt E. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular

function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007;28(21):2667-77.

162. Houtgraaf JH dDW, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, Geleijnse ML, Fernandez-Aviles F, Zijlsta F, Serruys PW, Duckers HJ. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with STsegment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(5):539-40.

163. Perin EC S-RR, Sánchez PL, Lasso J, Pérez-Cano R, Alonso-Farto JC, Pérez-David E, Fernández-Santos ME, Serruys PW, Duckers HJ, Kastrup J, Chamuleau S, Zheng Y, Silva GV, Willerson JT, Fernández-Avilés F. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J*. 2014;168(1):88-95.e2.

164. Ellison GM TD, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C, Purushothaman S, Galuppo V, Iaconetti C, Waring CD, Smith A, Torella M, Cuellas Ramon C, Gonzalo-Orden JM, Agosti V, Indolfi C, Galiñanes M, Fernandez-Vazquez F, Nadal-Ginard B. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(9):977-86.

165. Koudstaal S BM, Feyen DA, Waring CD, van Slochteren FJ, Dankers PY, Torella D, Sluijter JP, Nadal-Ginard B, Doevendans PA, Ellison GM, Chamuleau SA. Sustained delivery of insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor stimulates endogenous cardiac repair in the chronic infarcted pig heart. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014;7(2):232-41.

166. Penn MS MF, Schaer GL, Sherman W, Farr M, Pastore J, Rouy D, Clemens R, Aras R, Losordo DW. An open-label dose escalation study to evaluate the safety of administration of nonviral stromal cell-derived factor-1 plasmid to treat symptomatic ischemic heart failure. *Circ Res*. 2013;112(5):816-25.

167. Jujo K IM, Sekiguchi H, Klyachko E, Misener S, Tanaka T, Tongers J, Roncalli J, Renault MA, Thorne T, Ito A, Clarke T, Kamide C, Tsurumi Y, Hagiwara N, Qin G, Asahi M, Losordo DW. CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Circulation*. 2013;127(1):63-73.

168. Gustav Steinhoff JN, Markus Wolfien, Jana Große, Ulrike Ruch, Praveen Vasudevan, Paula Müller. Stem cells and heart disease - Brake or accelerator? *Adv Drug Deliv Rev*. 2017(120):2-24.

169. Szilvassy SJ BM, Van Zant G, Grimes B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by ex vivo expansion. *Blood*. 1999;93(5):1557-66.

170. Kamota T LT, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(19):1814-22.

171. Elmadbouh I HH, Jiang S, Idris NM, Lu G, Ashraf M. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1alpha promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(4):792-803.

172. Jiang Q SP, Wang E, Li J, Hu S, Zhang H. Remote ischemic postconditioning enhances cell retention in the myocardium after intravenous administration of bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;56:1-7.

173. M S. Cardiovascular biology. Hearts and bones. *Nature*. 2001;410(6829):640-1.

174. Loffredo FS SM, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):389-98.

175. Furlani D UM, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, Wang W, Yerebakan C, Li W, Gaebel R, Li RK, Vollmar B, Steinhoff G, Ma N. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res*. 2009;77(3):370-6.

176. De la Fuente LM SS, Argentieri J, Peñaloza E, Miano J, Koziner B, Bilos C, Altman PA. Transendocardial autologous bone marrow in chronic myocardial infarction using a helical needle catheter: 1-year follow-up in an open-label, nonrandomized, single-center pilot study (the TABMMI study). *Am Heart J*. 2007;154(1):79.e1-7.
177. Trachtenberg B VD, Williams AR, McNiece I, Fishman J, Nguyen K, Rouy D, Altman P, Schwarz R, Mendizabal A, Oskouei B, Byrnes J, Soto V, Tracy M, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Rationale and design of the transendocardial injection of autologous human cells (bone marrow or mesenchymal) in chronic ischemic left ventricular dysfunction and heart failure secondary to myocardial infarction (TAC-HFT) trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy. *Am Heart J*. 2011;161(3):487-93.
178. Behfar A LJ, Bartunek J, Homsy C, Daro D, Crespo-Diaz RJ, Stalboerger PG, Steenwinckel V, Seron A, Redfield MM, Terzic A. Optimized delivery system achieves enhanced endomyocardial stem cell retention. *Circ Cardiovasc Interv*. 2013;6(6):710-8.
179. Perin EC DH, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003;107(18):2294-302.
180. Losordo DW SR, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation*. 2007;115(25):3165-72.
181. Dib N MR, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, Binkley P, Buchele D, Anand I, Swingen C, Di Carli MF, Thomas JD, Jaber WA, Opie SR, Campbell A, McCarthy P, Yeager M, Dilsizian V, Griffith BP, Korn R, Kreuger SK, Ghazoul M, MacLellan WR, Fonarow G, Eisen HJ, Dinsmore J, Diethrich E. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation*. 2005;112(12):1748-55.
182. Stamm C KH, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(3):717-25.
183. Klein HM GA, Marktanner R, Poll L, Voelkel T, Mohammad Hasani MR, Piechaczek C, Feifel N, Stocksclaeder M, Burchardt ER, Kar BJ, Gregoric I, Gams E. Intramyocardial implantation of CD133+ stem cells improved cardiac function without bypass surgery. *Heart Surg Forum*. 2007;10(1):E66-E9.
184. Pompilio G SG, Liebold A, Pesce M, Alamanni F, Capogrossi MC, Biglioli P. Direct minimally invasive intramyocardial injection of bone marrow-derived AC133+stem cells in patients with refractory ischemia: preliminary results. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;56(2):71-6.
185. Bel A P-BV, Saito A, Bonnevie L, Bellamy V, Sabbah L, Bellabas L, Brinon B, Vanneaux V, Pradeau P, Peyrard S, Larghero J, Pouly J, Binder P, Garcia S, Shimizu T, Sawa Y, Okano T, Bruneval P, Desnos M, Hagège AA, Casteilla L, Pucéat M, Menasché P. Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation*. 2010;122(11 Suppl):S118-S23.
186. Hamdi H P-BV, Bel A, Neamatalla H, Saccenti L, Calderon D, Bellamy V, Bon M, Perrier MC, Mandet C, Bruneval P, Casteilla L, Hagège AA, Pucéat M, Agbulut O, Menasché P. Long-term functional benefits of epicardial patches as cell carriers. *Cell Transplant*. 2014;23(1):87-96.

187. Hamdi H P-BV, Bel A, Puymirat E, Geha R, Pidial L, Nematalla H, Bellamy V, Bouaziz P, Peyrard S, Casteilla L, Bruneval P, Hagège AA, Agbulut O, Menasché P. Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections. *Cardiovasc Res.* 2011;91(3):483-91.
188. Van Laake LW vDE, Monshouwer-Kloots J, Schreurs C, Passier R, Humbel BM, Doevendans PA, Sonnenberg A, Verkleij AJ, Mummery CL. Extracellular matrix formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(2):277-90.
189. Landa N ML, Feinberg MS, Holbova R, Shachar M, Freeman I, Cohen S, Leor J. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation.* 2008;117(11):1388-96.
190. Leor J TS, Guetta V, Manczur F, Castel D, Willenz U, Petneházy O, Landa N, Feinberg MS, Konen E, Goitein O, Tsur-Gang O, Shaul M, Klapper L, Cohen S. Intracoronary injection of in situ forming alginate hydrogel reverses left ventricular re-modeling after myocardial infarction in Swine. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(11):1014-23.
191. Dobner S BD, Govender P, Zilla P, Davies N. A synthetic non-degradable polyethylene glycol hydrogel retards adverse post-infarct left ventricular remodeling. *J Card Fail.* 2009;15(7):629-36.
192. Kofidis T LD, Martinez EC, Hoyt G, Tanaka M, Robbins RC. Novel injectable bioartificial tissue facilitates targeted, less invasive, large- scale tissue restoration on the beating heart after myocardial injury. *Circulation.* 2005;112(9 Suppl):I173-I7.
193. Frederick JR FJr, McCormick RC, Harris DA, Kim AY, Muenzer JR, Marotta N, Smith MJ, Cohen JE, Hiesinger W, Atluri P, Woo YJ. Stromal cell-derived factor-1alpha activation of tissue-engineered endothelial progenitor cell matrix enhances ventricular function after myocardial infarction by inducing neovascularogenesis. *Circulation.* 2010;122(11 Suppl):S107-S17.
194. Danoviz ME NJ, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, Antonio EL, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell re-tention. *PLoS One.* 2010;5(8):e12077.
195. Lin YD YM, Yang YJ, Tsai DC, Chu TY, Shih YY, Chang MY, Liu YW, Tang AC, Chen TY, Luo CY, Chang KC, Chen JH, Wu HL, Hung TK, Hsieh PC. Intramyocardial peptide nanofiber injection improves postinfarction ventricular re-modeling and efficacy of bone marrow cell therapy in pigs. *Circulation.* 2010;122(11 Suppl):S132-S41.
196. Thompson CA NB, Makower J, Houser S, McGarry M, Lamson T, Pomerantseva I, Chang JY, Gold HK, Vacanti JP, Oesterle SN. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(11):1964-71.
197. George JC GJ, Joseph M, Abdulhameed N, Crist J, Das H, Pompili VJ. Transvenous intramyocardial cellular delivery increases retention in comparison to intracoronary delivery in a porcine model of acute myocardial infarction. *J Interv Cardiol.* 2008;21(5):424-31.
198. Wang X JM, Li Q, Mansoor A, Qiang X, Swingen C, Panetta C, Zhang J. Stem cells for myocardial repair with use of a transarterial catheter. *Circulation.* 2009;120(11 Suppl):S238-S46.
199. Medicetty S WD, Lehman N, Raber A, Popovic ZB, Deans R, Ting AE, Penn MS. Percutaneous adventitial delivery of allogeneic bone marrow-derived stem cells via infarct-related artery improves long-term ventricular function in acute myocardial infarction. *Cell Transplant.* 2012;21(6):1109-20.
200. Siminiak T BP, Kurpisz M. Postinfarction heart failure: surgical and trans-coronary-venous transplantation of autologous myoblasts. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3(1 Suppl):S46-S51.

201. Patel AN MS, Turan G, Winters AA, Henry TD, Ince H, Trehan N. REVIVE trial: retrograde delivery of autologous bone marrow in patients with heart failure. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(9):1021–7.
202. Tuma J F-VR, Carrasco A, Castillo J, Cruz C, Carrillo A, Ercilla J, Yarleque C, Cunza J, Henry TD, Patel AN. Safety and feasibility of percutaneous retrograde coronary sinus delivery of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with chronic refractory angina. *J Transl Med.* 2011;9(183).
203. Zakharova L N-GH, Feehery L, Popovic S, Nimlos J, Gaballa MA. Retrograde coronary vein infusion of cardiac explant-derived c-Kit+ cells improves function in ischemic heart failure. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33(6):644–53.
204. Dib N KH, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(2):177–81.
205. Hong SJ HD, Brinton TJ, Johnstone B, Feng D, Rogers P, Fearon WF, Yock P, March KL. Intracoronary and retrograde coronary venous myocardial delivery of adipose-derived stem cells in swine infarction lead to transient myocardial trapping with predominant pulmonary redistribution. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014;83(1):E17-E25.
206. Halkos ME ZZ, Kerendi F, Wang NP, Jiang R, Schmarkey LS, Martin BJ, Quyyumi AA, Few WL, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(6):525–36.
207. Wang W JQ, Zhang H, Jin P, Yuan X, Wei Y, Hu S. Intravenous administration of bone marrow mesenchymal stromal cells is safe for the lung in a chronic myocardial infarction model. *Regen Med.* 2011;6(2):179–90.
208. Houtgraaf JH dDW, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, Geleijnse ML, Fernandez-Aviles F, Zijlsta F, Serruys PW, Duckers HJ. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(5):539–40.
209. Lohan P CC, Murphy JM, Griffin MD, Ritter T, Ryan AE. Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned? *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(4):99.
210. Jansen Of Lorkeers SJ EJ, Vesterinen HM, van der Spoel TI, Sena ES, Duckers HJ, Doevendans PA, Macleod MR, Chamuleau SA. Similar effect of autologous and allogeneic cell therapy for ischemic heart disease: systematic review and meta-analysis of large animal studies. *Circ Res.* 2015;116(1):80–6.
211. Karantalis V HJ. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116(8):1413–30.
212. Boukouaci W LL, Siewiera J, Dam N, Hocine HR, Khaznadar Z, Tamouza R, Borlado LR, Charron D, Jabrane-Ferrat N, Al-Daccak R. Natural killer cell crosstalk with allogeneic human cardiac-derived stem/progenitor cells controls persistence. *Cardiovasc Res.* 2014;104(2):290–302.
213. Lauden L BW, Borlado LR, López IP, Sepúlveda P, Tamouza R, Charron D, Al-Daccak R. Allogenicity of human cardiac stem/progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1. *Circ Res.* 2013;112(3):451–64.
214. Al-Daccak R CD. Allogenic benefit in stem cell therapy: cardiac repair and regeneration. *Tissue Antigens.* 2015;86(3):155–62.
215. Crisostomo V B-DC, Maestre J, Garcia-Lindo M, Sun F, Casado JG, Blazquez R, Abad JL, Palacios I, Rodriguez-Borlado L, Sanchez-Margallo FM. Delayed administration of allogeneic cardiac stem cell therapy for acute myocardial infarction could ameliorate adverse remodeling: experimental study in swine. *J Transl Med.* 2015;13(156).
216. Thygesen K AJ, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction, Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky

- BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Writing Group on the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012;33(20):2551-67.
217. Clifford DM FS, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;2(CD006536).
218. Antoni ML HG, Boden H, Liem SS, Boersma E, Fox K, Schalij MJ, Bax JJ, Delgado V. Cardiovascular mortality and heart failure risk score for patients after ST-segment elevation acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention (Data from the Leiden MISSION! Infarct Registry). *Am J Cardiol*. 2012;109(2):187-94.
219. Steg PG JS, Atar D, Badano LP, Blömostrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't Hof A, Widimsky P, Zahger D. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012;33(20):2569-619.
220. Liang KY ZS. Longitudinal data analysis of continuous and discrete responses for pre-post designs. *Sankhya: The Indian Journal of Statistics, Series B*. 2000;62(1):134-48.
221. Francois M KP, Beltrame M. Sox F genes: key players in the development of the cardio-vascular system. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(3):445-8.
222. Pikkarainen S TH, Kerkelä R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63(2):196-207.
223. Fernández-Avilés F S-RR, Climent AM, Badimon L, Bolli R, Charron D, Fuster V, Janssens S, Kastrup J, Kim HS, Lüscher TF, Martin JF, Menasché P, Simari RD, Stone GW, Terzic A, Willerson JT, Wu JC; the TACTICS (Transnational Alliance for Regenerative Therapies in Cardiovascular Syndromes) Writing Group. Global position paper on cardiovascular regenerative medicine. *Eur Heart J*. 2017;38(33):2532-46.
224. Jernberg T HP, Henriksson M, Hjelm H, Thuresson M, Janzon M. Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *Eur Heart J*. 2015;36(19):1163-70.
225. Ridker PM EB, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-31.
226. Hare JM DD, Rieger AC, Florea V, Landin AM, El-Khorazaty J, Khan A, Mushtaq M, Lowery MH, Byrnes JJ, Hendel RC, Cohen MG, Alfonso CE, Valasaki K, Pujol MV, Golpanian S, Gherlin E, Fishman JE, Pattany P, Gomes SA, Delgado C, Miki R, Abuzeid F, Vidro-Casiano M, Premer C, Medina A, Porras V, Hatzistergos KE, Anderson E, Mendizabal A, Mitrani R, Heldman AW. Randomized comparison of allogeneic versus autologous mesenchymal stem cells for nonischemic dilated cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(5):526-37.
227. Stone GW SH, Thiele H, Patel MR, Udelson JE, Ohman EM, Maehara A, Eitel I, Granger CB, Jenkins PL, Nichols M, Ben-Yehuda O. Relationship between infarct size and outcomes following primary PCI: patient-level analysis from 10 randomized trials. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(14):1674-83.
228. Malliaras K ME. Moving beyond surrogate endpoints in cell therapy trials for heart disease. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1):2-6.

229. Sürder D MR, Moccetti T, Lo Cicero V, Emmert MY, Klersy C, Soncin S, Turchetto L, Radrizzani M, Zuber M, Windecker S, Moschovitis A, Bühler I, Kozerke S, Erne P, Lüscher TF, Corti R. Effect of bone marrow-derived mononuclear cell treatment, early or late after acute myocardial infarction: twelve months CMR and long-term clinical results. *Circ Res*. 2016;119(3):481-90.
230. Traverse JH HT, Vaughan DE, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Simpson LM, Penn MS, Byrne BJ, Perin EC, Gee AP, Hatzopoulos AK, McKenna DH, Forder JR, Taylor DA, Cogle CR, Baraniuk S, Olson RE, Jorgenson BC, Sayre SL, Vojvodic RW, Gordon DJ, Skarlatos SI, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network. LateTIME: a phase-II, randomized, double-blinded, placebo-controlled, pilot trial evaluating the safety and effect of administration of bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks after acute myocardial infarction. *Tex Heart Inst J*. 2010;37(4):412-20.
231. de Jong R HJ, Samiei S, Boersma E, Duckers HJ. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014;7(2):156-67.
232. Fisher SA ZH, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015.
233. Gyöngyösi M WW, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J, Marban E, Assmus B, Henry TD, Traverse JH, Moyé LA, Sürder D, Corti R, Huikuri H, Miettinen J, Wöhrle J, Obradovic S, Roncalli J, Malliaras K, Pokushalov E, Romanov A, Kastrup J, Bergmann MW, Atsma DE, Diederichsen A, Edes I, Benedek I, Benedek T, Pejkov H, Nyolczas N, Pavo N, Bergler-Klein J, Pavo IJ, Sylven C, Berti S, Navarese EP, Maurer G; ACCRUE Investigators. ACCRUE Investigators. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac sTudiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res*. 2015;116(8):1346-60.
234. Traverse JH HT, Moyé LA. Is the measurement of left ventricular ejection fraction the proper end point for cell therapy trials? An analysis of the effect of bone marrow mononuclear stem cell administration on left ventricular ejection fraction after ST-segment elevation myocardial infarction when evaluated by cardiac magnetic resonance imaging. *Am Heart J*. 2011;162(4):671-7.
235. Savoye C EO, Tricot O, Nogue O, Segrestin B, Sautière K, Elkohen M, Pretorian EM, Taghipour K, Philias A, Aumégeat V, Decoulx E, Ennezat PV, Bauters C. REmodelage VEntriculaire study group. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REmodelage VEntriculaire [REVE] study group). *Am J Cardiol*. 2006;98(9):1144-9.
236. Tokita Y TX, Li Q, Wysoczynski M, Hong KU, Nakamura S, Wu WJ, Xie W, Li D, Hunt G, Ou Q, Stowers H, Bolli R. Repeated administrations of cardiac progenitor cells are markedly more effective than a single administration: a new paradigm in cell therapy. *Circ Res*. 2016;119(5):635-51.
237. Karantalis V S-LV, Bagno L, Golpanian S, Wolf A, Sanina C, Premer C, Kanelidis AJ, McCall F, Wang B, Balkan W, Rodriguez J, Rosado M, Morales A, Hatzistergos K, Natsumeda M, Margitich I, Schulman IH, Gomes SA, Mushtaq M, DiFede DL, Fishman JE, Pattany P, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Synergistic effects of combined cell therapy for chronic ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(18):1990-9.